

Entwicklung und Evaluierung von auf monoklonalen Antikörpern
basierenden Sandwich Enzymimmuntests für den serotypspezifischen
Nachweis von *Cronobacter sakazakii*

von Eva Jasmin Scharinger

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Entwicklung und Evaluierung von auf monoklonalen Antikörpern
basierenden Sandwich Enzymimmuntests für den serotypspezifischen
Nachweis von *Cronobacter sakazakii*

von Eva Jasmin Scharinger

aus Kairo

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin
Märtlbauer

Mitbetreuung durch: Dr. Richard Dietrich und Dr. Kristina Schauer

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer
Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Karin Schwaiger

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

*Für meine Eltern und
für Max.*

*Schau ma moi, dann seng mas scho.
Und wenn ned, wer woas fia wos guad is.*

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. SCHRIFTTUM.....	3
1. Taxonomische Stellung und Serotypisierung	3
2. Vorkommen und Verbreitung von <i>Cronobacter</i> spp.....	7
3. Pathogene Bedeutung von <i>Cronobacter sakazakii</i>	9
3.1. Erkrankungen bei Erwachsenen	9
3.2. Erkrankungen bei Neonaten	10
3.3. Stressbedingte Adaptationsmechanismen	12
4. Nachweisverfahren für <i>Cronobacter sakazakii</i>	13
4.1. Klassische mikrobiologische Verfahren	13
4.2. Molekularbiologische Nachweisverfahren.....	14
4.3. Immunchemische Nachweisverfahren	15
4.4. Apparative Nachweismethoden	16
III. PUBLIKATION.....	18
IV. DISKUSSION.....	54
1. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper.....	55
2. Etablierung und Anwendung von Sandwich EIA-Systemen	61
3. Ausblick.....	63
V. ZUSAMMENFASSUNG	66
VI. SUMMARY	67
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	68
VIII. ANHANG	79
1. Monoklonale Antikörper gegen <i>C. sakazakii</i> Serotyp O7.....	79
2. Monoklonale Antikörper gegen <i>C. malonaticus</i> Serotyp O2.....	82

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHO	Chinese hamster ovary
CSB	<i>Cronobacter</i> screening broth
EE	<i>Enterobacteriaceae</i> enrichment (broth)
EIA	Enzymimmuntest (Enzyme Immunoassay)
EPS	Exopolysaccharid
ESIA	<i>Enterobacter sakazakii</i> isolation agar
ESPM	<i>Enterobacter sakazakii</i> chromogenic plating medium
FDA	Food and Drug Administration
GPW	Gepuffertes Peptonwasser
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
ISO	International Standards Organization
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Bouillon)
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
mAk	Monoklonaler Antikörper
mDFI	Modified Druggan, Forsythe, and Iversen (Agar)
MHI	Milchhygieneinstitut, Präfix für Stämme der Stammsammlung
mLST	Modifizierte Laurylsulfat Tryptose Bouillon
MLST	Multi Locus Sequenz Typisierung
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
OmpA	Outer membrane protein A
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIF	Säuglingsmilchpulver (powdered infant formula)
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
TFP	Type four pili
TSA	Trypton-Soja-Agar
VRBG	Violet red bile glucose (Agar)
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Cronobacter spp. sind ubiquitäre, opportunistische und oft lebensmittelassoziierte Gram-negative Pathogene. Von den derzeit sieben als eigenständige Spezies anerkannten Vertretern kommt neben *C. malonaticus* und *C. turicensis* insbesondere der Spezies *C. sakazakii* größere Bedeutung zu, da sie mit schwerwiegenden Infektionen in Verbindung gebracht wird.

Bei immunsupprimierten und älteren Erwachsenen treten durch *C. sakazakii* verursachte nosokomiale Infektionen beispielsweise im Rahmen von Operationen bzw. Verweilkathetern auf. Eine besondere Rolle spielt *C. sakazakii* allerdings als Verursacher seltener, meist tödlich verlaufender Infektionen im Bereich der Neonatologie. Besonders frühgeborene Neonaten mit geringem Geburtsgewicht gelten als Risikogruppe. Epidemiologisch konnten Erkrankungen meist mit der oralen oder parenteralen Aufnahme von pulverförmiger Säuglingsnahrung (*powdered infant formula*, PIF) in Verbindung gebracht werden. Klinisch äußert sich eine Infektion typischerweise in hämorrhagischer Enteritis, Sepsis und Meningitis und verläuft in bis zu 80 % der Fälle tödlich. Selbst bei Überleben der Patienten bleiben oft schwerwiegende neurologische Schäden zurück. Sowohl aus klinischen als auch aus lebensmittelassoziierten Proben wurden von den sieben beschriebenen *C. sakazakii* Serotypen (O1-O7) die Serotypen O1-O3 am häufigsten isoliert.

Milchpulver und pulverförmige Säuglingsnahrung werden derzeit mittels standardisierter kultureller Methoden spezies- und serotypenspezifisch auf das Vorhandensein von *Cronobacter* spp. überprüft. Aufgrund zahlreicher Kultivierungsschritte verstreichen bis zur möglichen Bestätigung einer Probe bis zu 6 Tage. Ziel dieser Arbeit war es daher das zeitaufwendige kulturelle Schnellnachweis mit simultaner Serotypisierung für *C. sakazakii* zu ergänzen. Dafür wurden im Zuge dieser Arbeit neben dem bereits vorhandenen, Verfahren

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13N12611 gefördert.

Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß §10a des Tierschutzgesetzes angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.6-2-12 genehmigt.

um einen auf monoklonalen Antikörpern (mAbs) basierenden für *C. sakazakii* Serotyp O1-spezifischen mAb 1C4 (Kleinstauber, 2015), weitere serotypspezifische mAbs generiert und Sandwich Enzymimmuntests (EIAs) zum Nachweis von *C. sakazakii* etabliert.

II. SCHRIFTTUM

1. Taxonomische Stellung und Serotypisierung

Das Genus *Cronobacter* umfasst eine Gruppe ubiquitärer, peritrich begeißelter, motiler, nicht-sporenbildender, fakultativ anaerober Stäbchen aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Von Urmenyi & Franklin (1961) wurden erstmals zwei fatale Fälle von neonataler Meningitis und Sepsis beschrieben, deren Erreger als „gelb pigmentierte *Enterobacter cloacae*“, einer Biogruppe von *Enterobacter cloacae*, identifiziert wurden. Brenner (1974) gab den ersten Hinweis, dass diese „gelb pigmentierten *Enterobacter cloacae*“, deren DNA-DNA-Hybridisierungsrate mit *E. cloacae* weniger als 50 % betrug, eine eigenständige Spezies darstellt. Farmer *et al.* (1980) zeigten schließlich, dass auch die biochemischen und phänotypischen Eigenschaften sowie die Antibiotikaresistenzen deutliche Unterschiede aufwiesen und beschrieben erstmals die neue Spezies *Enterobacter sakazakii* mit 15 Biogruppen. Iversen *et al.* (2007a) reklassifizierten auf Basis von molekularbiologischen Untersuchungen das Genus *Enterobacter* als *Cronobacter* und beschrieben die neuen Spezies *C. sakazakii* mit den beiden Subspezies *sakazakii* und *malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* mit den Subspezies *dublinensis*, *lausannensis* und *lactaridi*, *C. turicensis* und *C. genomospecies 1*. Kurz darauf wurden die beiden zuvor beschriebenen Subspezies von *C. sakazakii* als eigene Spezies *C. sakazakii* und *C. malonaticus* klassifiziert (Iversen *et al.*, 2008b). 2012 wurde die neue Spezies *C. condimenti* zum Genus *Cronobacter* hinzugefügt und *C. genomospecies 1* in *C. universalis* umbenannt (Joseph *et al.*, 2012a). Basierend auf multilocus sequence typing (MLST) Analysen wurden 2013 drei weitere apathogene Spezies *E. helveticus*, *E. pulveris*, und *E. turicensis* dem Genus *Cronobacter* zugeordnet (Brady *et al.*, 2013). Weitere Untersuchungen basierend auf umfangreichen Genomanalysen und biochemischen Charakterisierungen zeigten allerdings, dass diese Spezies weder dem Genus *Enterobacter* noch dem Genus *Cronobacter* zuzuordnen sind und es wurde daher deren Reklassifizierung als *Franconibacter pulveris* comb. nov., *Franconibacter helveticus* comb. nov. und *Siccibacter turicensis* comb. nov. vorgeschlagen (Stephan *et al.*, 2014).

Die derzeit aktuelle taxonomische Klassifizierung von *Cronobacter* spp. stellt sich

somit wie folgt dar:

Familie: *Enterobacteriaceae*

Gattung: *Cronobacter*

Spezies:

C. sakazakii

C. malonaticus

C. turicensis

C. muytjensii

C. dublinensis

C. condimenti

C. universalis

Innerhalb einer Spezies können Gram-negative Bakterien, basierend auf der Zusammensetzung des Lipopolysaccharids (LPS) zusätzlich in verschiedene Serotypen eingeteilt werden. Das hoch konservierte Lipid A, welches das LPS in der Zellwand verankert, ist über glykosidische Bindung mit dem Kernoligosaccharid (*Core*) verbunden. Die Einteilung in Serotypen ist auf die Zusammensetzung der dem *Core* angeschlossenen hoch variablen O-spezifischen Seitenkette zurückzuführen. Die Unterschiede dieser Struktur beruhen auf der Zusammensetzung und der chemischen Verbindung von sich wiederholenden „*repeating units*“, welche aus 4-5 verschiedenen Zuckerresten bestehen (Wang *et al.*, 2010). Für etliche Vertreter der *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, etc.) diente das LPS-Biosynthese-Cluster, welches meist von *galF* und *gnd* Genen flankiert wird, als Grundlage für die Etablierung von PCR-Methoden, die die Einteilung in Serotypen erlauben (Wang *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2008a, Liu *et al.*, 2008b, Liu *et al.*, 2011).

Hinsichtlich *C. sakazakii* wurden zuerst die Serotypen O1 und O2 anhand des Genlocus *rfb* molekularbiologisch definiert. Mittels serotypspezifischer Oligonukleotide (Primer) für die Glykosyltransferase-kodierenden Gene *wehC* (Serotyp O1) und *wehI* (Serotyp O2) wurde erstmals von Mullane *et al.* (2008) ein PCR-Assay für diese beiden Serotypen etabliert (Tabelle 1).

Basierend auf der Diversität der Oberflächenantigene wurde bereits von

Kauffman in den 1940er Jahren die serologische Bestimmung von Salmonellen beschrieben und gilt seitdem als anerkannte Methode auch für zahlreiche andere Gram-negative Bakterien. Für *C. sakazakii* entwickelten Sun *et al.* (2011) ein auf der Agglutination von Kaninchenserum basierendes Serotypisierungsschema für die bereits von Mullane *et al.* (2008) beschriebenen Serotypen O1 und O2 sowie für fünf neue *C. sakazakii* Serotypen O3-O7, mit dem 119 *C. sakazakii*-Stämme serotypisiert wurden. Dabei wurden die von Mullane *et al.* (2008) zuerst beschriebenen Serotypen O1 und O2 mit insgesamt 69,7 % der untersuchten Stämme am häufigsten identifiziert.

Tabelle 1: Serotypisierung nach dem Mullane-Jarvis-Schema

Serotyp	Gen	Funktion	Referenz
O1	<i>wehC</i>	Glykosyltransferase	Mullane <i>et al.</i> (2008)
O2	<i>wehI</i>	Glykosyltransferase	Mullane <i>et al.</i> (2008)
O3	<i>wzx</i>	O-Antigen-Flippase	Jarvis <i>et al.</i> (2011)
O4	<i>wzx</i>	O-Antigen-Flippase	Jarvis <i>et al.</i> (2013)

Tabelle 2: Serotypisierung nach dem Sun-Schema

Serotyp	Gen	Funktion	Referenz
O1	<i>wzy</i>	O-Antigen-Polymerase	Sun <i>et al.</i> (2012)
O2	<i>wzy</i>		
O3	<i>wzy</i>		
O4	<i>wzy</i>		
O5	<i>wzy</i>		
O6	<i>wzy</i>	O-Antigen-Flippase	
O7	<i>wzx</i>		

Jarvis *et al.* (2011) designten für *C. sakazakii* Serotyp O3 *wzx*-spezifische Primer und etablierten so einen für diesen Serotyp spezifischen PCR-Nachweis (Tabelle 1). In weiteren Arbeiten sequenzierten Sun *et al.* (2012) die LPS-Biosynthese-Cluster der verbleibenden *C. sakazakii* Serotypen O4-O7 und konstruierten für die Serotypen O1-O6 *wzy*- bzw. für den Serotyp O7 *wzx*-spezifische Primer, um in einer multiplex PCR alle *C. sakazakii* Serotypen O1-O7 gleichzeitig bestimmen zu können (Tabelle 2). Zur selben Zeit etablierten auch Jarvis *et al.* (2013) eine auf dem *wzy*-Gen basierende Serotypisierung des *C. sakazakii* Serotyps O4 (Tabelle 1).

Neuere Studien zweifeln jedoch die Richtigkeit der von Sun *et al.* (2012) vorgenommenen Einteilung der *C. sakazakii* Serotypen O5 und O6 an, da die für diese Serotypen spezifischen Primer z.T. auch andere *Cronobacter* spp.-Stämme erkennen. So verglichen bspw. Yan & Fanning (2015) die von Sun *et al.* (2012) etablierte multiplex PCR (Tabelle 2) mit dem als „Mullane-Jarvis“ (Mullane *et al.*, 2008, Jarvis *et al.*, 2011, Jarvis *et al.*, 2013) bezeichneten Verfahren (Tabelle 1) und serotypisierten 409 *Cronobacter* spp.-Isolate. Dabei konnte festgestellt werden, dass die „Sun-Primer“ für Serotyp O5 mit keinem der *C. sakazakii*-Stämme, jedoch mit allen *C. turicensis*-Stämmen vom Serotyp O3 reagierten. Des Weiteren reagierten die „Sun-Primer“ für *C. sakazakii* Serotyp O6 mit 28 von 30 Stämmen, welche mit dem „Mullane-Jarvis“-Schema als *C. malonaticus* Serotyp O2 identifiziert werden konnten.

Blažková *et al.* (2015) weisen darauf hin, dass die Serotypisierung von *C. sakazakii* der Serotypen O5 und O6 mit den von Sun *et al.* (2012) entwickelten Primern nicht eindeutig ist, da die Charakterisierung der entsprechenden Stämme mittels chromogenem Agar und 16S-rRNA-Sequenzierung vorgenommen worden war. Diese Kriterien gelten inzwischen jedoch als unzureichend für die exakte Identifizierung von *C. sakazakii* (Iversen *et al.*, 2007b, Joseph *et al.*, 2012a, Joseph *et al.*, 2012c). Blažková *et al.* (2015) konnten die beiden *Cronobacter*-Stämme, die von Sun *et al.* (2012) zum Primerdesign für *C. sakazakii* Serotyp O5 und O6 (Stämme G2706 und G2708) verwendet wurden, mittels verschiedener Analysen (MLST, Genomsequenz, RFLP, LPS-Ladderstruktur, O-Antigenstruktur) schließlich als *C. malonaticus* identifizieren. Die Autoren schlugen somit vor, die ursprünglich als *C. sakazakii* Serotyp O6 beschriebenen

Stämme zu *C. malonaticus* Serotyp O2 zu reklassifizieren. Zusätzlich wurde zu den bisher beschriebenen *C. malonaticus* Serotypen O1 und O2 ein neuer Serotyp, *C. malonaticus* Serotyp O3 eingeführt, welcher die ursprünglichen *C. sakazakii* Serotyp O5-Stämme umfasst. Außerdem wurde vorgeschlagen, den *Cronobacter*-Stamm G3882, der als *C. turicensis* O2 identifiziert wurde, laut *Cronobacter* PubMLST-Datenbank aber der Spezies *C. malonaticus* zuzuordnen ist, als Referenzstamm für den neuen *C. malonaticus* Serotyp O4 zu verwenden. Somit stellt sich die Serotypeinteilung der verschiedenen *Cronobacter*-Spezies wie folgt dar:

C. sakazakii O1-O4, O7

C. malonaticus O1-O4

C. turicensis O1-O3

C. muytjensii O1-O2

C. dublinensis O1-O2

C. condimenti O1

C. universalis O1-O2

2. Vorkommen und Verbreitung von *Cronobacter* spp.

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung, konnte *Cronobacter* spp. bereits in einer Vielzahl von tierischen und pflanzlichen Nahrungsmitteln nachgewiesen werden. Sowohl das Auftreten in frischen, gefrorenen, fermentierten oder gekochten Produkten (Hochel & Škvor, 2009, Miled-Bennour *et al.*, 2010, Mozrová *et al.*, 2014) als auch das Vorkommen in Getränken und in Wasser (Friedemann, 2007) wurde beschrieben. Die hohe Tenazität gegenüber Austrocknung ermöglicht es diesen Bakterien auch in getrockneten Lebensmitteln wie Kräutertee, Gewürzen und Müsli zu persistieren. Baumgartner *et al.* (2009) haben 168 Proben von verzehrfertigen Lebensmitteln auf das Vorhandensein von *Cronobacter* spp. mittels selektiver Anreicherung und anschließendem Nachweis auf einem spezifischen chromogen Agar [*Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA); *Enterobacter sakazakii* chromogenic plating medium (ESPM); Druggan, Forsythe, and Iversen Agar (DFI)] überprüft. Dabei wurden in 60,9 % der Proben

aus Sprossen bzw. frischen Salaten und Kräutern, 26,9 % der Proben aus getrockneten Gewürzen und Kräutern und 7,1 % der Proben aus Konditoreiprodukten *Cronobacter* spp. nachgewiesen. Mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) konnte zudem gezeigt werden, dass fünf Isolate aus zwei verschiedenen Konditoreiprodukt-Proben, welche jeweils aus einer Konditorei über einen Zeitraum von 11 Monaten bezogen wurden, einen identischen genetischen Fingerabdruck aufwiesen. Diese Ergebnisse verdeutlichen zwei charakteristische Merkmale der Verbreitung von *Cronobacter* spp.: Zum einen tritt das Bakterium sporadisch in einer Vielzahl verschiedener Lebensmittel auf, zum anderen besteht die Möglichkeit einer persistierenden Kontamination der Produktionsstätte – und damit der dort produzierten Lebensmittel – über einen längeren Zeitraum.

Als mögliche natürliche Reservoirs für *Cronobacter* spp. kommen z.B. Insekten (Kuzina *et al.*, 2001, Hamilton *et al.*, 2003), Ratten (Gakuya *et al.*, 2001) oder Pflanzen (Jaradat *et al.*, 2009) in Frage. Neuere Studien bezeichnen allerdings allgemein die Umwelt als Reservoir. Grim *et al.* (2013) konnten durch komparative Genomanalyse ein sogenanntes *Cronobacter core* Genom ermitteln, welches gemeinsame orthologe Gene für die Spezies *C. malonaticus*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. universalis*, *C. sakazakii* und *C. turicensis* aufweist. In diesem Kerngenom konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die für den Transport bzw. die Verwertung pflanzlicher Bestandteile, wie bspw. Maltose, Arabinogalactan oder Xylose kodieren oder dem Bakterium Resistenz gegen Phytotoxine verleihen. Diese Erkenntnisse sprechen generell für einen pflanzenassoziierten Ursprung von *Cronobacter* spp. Aus denselben Daten geht zudem hervor, dass das *Cronobacter*-Genus einer bidirektionalen Divergenz unterliegt. So ist die *C. dublinensis*-*C. muytjensii*-Gruppe (*clade*) vor allem an die Umwelt- und Pflanzen-Nische adaptiert, während die andere *clade*, hauptsächlich bestehend aus *C. sakazakii* und *C. malonaticus*, durch den Erwerb zusätzlicher Gene in ihrer Virulenz gesteigert und an Wirtsorganismen adaptiert ist.

Das Auftreten von *Cronobacter* spp. in der Umwelt spielt für die öffentliche Gesundheit eine untergeordnete Rolle. Allerdings ist der ubiquitäre Charakter bedeutend für die Kontamination von *powdered infant formula* (PIF) und die damit einhergehenden schweren Erkrankungen bei Kleinkindern. Hinsichtlich des

Vorkommens von *Cronobacter* spp. in PIF können eine intrinsische und eine extrinsische Kontamination unterschieden werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass bereits kontaminierte Grundzutaten verarbeitet werden oder dass das Produkt während des Produktionsprozesses (Trocknung, Mischung) noch in der Produktionsstätte kontaminiert wird (intrinsisch). Zum anderen kann vorerst unbedenkliche PIF-Nahrung nach Rekonstitution durch falsche Aufbewahrungs- und Hygienemaßnahmen im eigenen Haushalt oder in Krankenhäusern verunreinigt werden (extrinsisch) (Simmons *et al.*, 1989, Noriega *et al.*, 1990, FAO/WHO, 2004). Die hohe Toleranz gegenüber osmotischem Stress, Hitze und Trockenheit, sowie die Fähigkeit zur Biofilmbildung begünstigen die Persistenz dieser Bakterien in PIF und in der Umgebung (Nazarowec-White & Farber, 1997b, Breeuwer *et al.*, 2003, Iversen *et al.*, 2004).

3. Pathogene Bedeutung von *Cronobacter sakazakii*

3.1. Erkrankungen bei Erwachsenen

Häufiger als bei Neugeborenen treten *C. sakazakii*-Infektionen bei Erwachsenen auf. Aufgrund fehlender rechtlicher Bestimmungen zur Meldepflicht bestätigter Erkrankungen und der günstigen Resistenzlage – eine Therapie mit Antibiotika ist meist erfolgreich – werden Ausbrüche allerdings weitaus seltener in der Literatur beschrieben als bei Säuglingen. Lai (2001) untersuchte acht Fallberichte in Zusammenhang mit einer *C. sakazakii*-Infektion bei Erwachsenen zwischen 1995-1996. In allen Fällen waren diese Patienten durch eine ernsthafte Vorerkrankung immunsupprimiert, 50 % der Patienten hatten bspw. eine bösartige Tumorerkrankung. Die Symptomatik einer *C. sakazakii*-Infektion ist bei Erwachsenen zudem vielfältiger als bei Neonaten. So wurden neben dem Auftreten von Sepsis auch Leiden wie Konjunktivitis, Pneumonie, Osteomyelitis, Wundinfektion, Harnwegsinfektion und Abszeßbildung beschrieben (Gosney *et al.*, 2006, Friedemann, 2009, Flores *et al.*, 2011, Yan *et al.*, 2012, Tsai *et al.*, 2013, Patrick *et al.*, 2014). Die Letalität fiel dabei weitaus geringer aus als bei Neonaten.

Kim *et al.* (2008) untersuchten mehr als tausend in koreanischen Krankenhäusern genommene Stuhlproben auf das Vorhandensein von *C. sakazakii*. Dabei waren

neben den Proben von zwei Neonaten auch die Proben von zwei Erwachsenen positiv, ohne dass bei den Erwachsenen die Symptome eindeutig mit einer *Cronobacter* spp.-Infektion in Zusammenhang gebracht werden konnten. Außerdem waren diese Isolate im Gegensatz zu denen aus den erkrankten Säuglingen empfindlich für eine Behandlung mit Ampicillin und Cefazolin. Aufgrund des ubiquitären Charakters ist eine orale Aufnahme der Bakterien über kontaminierte Lebensmittel und eine anschließende Kolonisierung in Mundhöhle und Darm bei Erwachsenen denkbar (Farmer *et al.*, 1980, Galili *et al.*, 1995, Friedemann, 2007). Wahrscheinlicher ist allerdings eine nosokomiale Infektion über kontaminiertes medizinisches Material wie Verweilkatheter oder eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch (Friedemann, 2009, Flores *et al.*, 2011).

3.2. Erkrankungen bei Neonaten

Eine Infektion von Neonaten mit *C. sakazakii* kann sich pathogenetisch als nekrotisierende Enterocolitis (NEC), Sepsis und/oder Meningitis manifestieren, wobei laut Bowen & Braden (2006) Neugeborene bzw. Frühgeborene mit geringem Geburtsgewicht öfter an ZNS-Schäden und schwerere Neugeborene eher an Sepsis leiden. Die Häufigkeit von invasiv auftretenden *C. sakazakii*-Infektionen wird auf 1 Fall pro 100.000 Säuglinge im Alter von < 12 Monaten und auf 8,7 Fälle pro 100.000 Säuglinge mit geringem Geburtsgewicht geschätzt (FAO/WHO, 2004). Absolut werden den US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention ca. 4-6 Fälle jährlich gemeldet (CDC, 2011). Laut Stoll *et al.* (2004) sind Säuglinge mit sehr geringem Geburtsgewicht (< 1500 g) anfälliger für *Cronobacter*-Infektionen und das Risiko wird mit 9,4 Fällen pro 100.000 Säuglinge etwas höher geschätzt.

In Bezug auf die Infektionsquelle wird davon ausgegangen, dass sich einzelne im Milchpulver enthaltene *Cronobacter*-Zellen durch unzureichende Hygienemaßnahmen und eine falsche Lagerung rekonstituierter PIF massenhaft vermehren können. Deswegen hat die WHO für die Versorgung von Säuglingen mit pulverförmiger Nahrung konkrete Empfehlungen ausgesprochen. Um das Risiko einer *Cronobacter*-Infektion zu minimieren, sollte demnach PIF nach der Zubereitung mit > 70 °C heißem Wasser nicht länger als 2 Stunden gelagert werden (WHO/FAO, 2007).

Auch Magensonden, die im Rahmen einer Intensivversorgung gelegt werden und über mehrere Tage im Säuglingskörper verbleiben, stellen ein Risiko für Säuglinge dar. Im Lumen solcher Sonden können sich die Bakterien innerhalb von 24 Stunden bis zu einer Dichte von 10^9 CFU/ml vermehren (Hurrell *et al.*, 2009). Die Fähigkeit von *C. sakazakii* Biofilme zu bilden, ermöglicht die Persistenz des Pathogens in den Sonden und durch Ablösung von Biofilm-assoziiertem verklumptem Keimmateriale kann jede weitere Fütterungsportion kontaminiert werden. Von Biofilm umgebene Bakterien können außerdem geschützt vor Magensäure direkt in den Darm gelangen, wo sie die Darmepithelzellen kolonisieren. Nach Überwinden der Darmschranke werden sie schließlich über den Blutkreislauf in das ZNS transportiert. Dem Pathogen stehen zahlreiche Virulenzfaktoren zur Verfügung. Beispielsweise sind für die Kolonisierung des Darmes Typ-IV Pili (TFP) von großer Bedeutung. Auch andere bekannte Meningitis-verursachende Bakterien wie *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* nutzen TFP um das Darmepithel zu kolonisieren und im weiteren Infektionsverlauf den im Kapillarbett der Blut-Hirn-Schranke wirkenden Scherkräften standzuhalten. Grim *et al.* (2013) konnten eines der für TFP kodierenden Gene, nämlich das *pilT*-Gen, bereits in dem oben erwähnten *Cronobacter core* Genom identifizieren.

Auch Flagellen, die bei Bakterien vor allem für die Bewegung in Flüssigkeiten und auf Oberflächen notwendig sind, befähigen zur Adhäsion an Darmepithelzellen oder an mikrovaskuläre Endothelzellen. Hartmann *et al.* (2010) untersuchten Flagellenmutanten und konnten zeigen, dass sich die Abwesenheit bzw. die unterschiedlich ausgeprägte Brüchigkeit von Flagellen deutlich auf die Adhäsionsfähigkeit von *C. sakazakii* an Caco-2 Epithelzellen auswirkte. Alle Mutanten zeigten eine starke Beeinträchtigung ihres Adhäsionsverhaltens, das somit dem des nicht adhärenen *E. coli* K-12-Stamm ähnelte.

Zusätzlich beschrieben Pagotto *et al.* (2003) die Fähigkeit von *C. sakazakii* proteolytische Enzyme zu produzieren, welche bei Mäusen an der Infektionsstelle zu einer Zelllyse und damit verbundener Gewebsschädigung führten. Des Weiteren konnten Kothary *et al.* (2007) ein für eine Zink-Metalloprotease kodierendes *zpx*-Gen identifizieren. Diese Protease führt *in vitro* zu einer Deformation und Schädigung von CHO (chinese hamster ovary)-Zellen.

Zahlreiche Studien zeigten, dass für die invasiven Eigenschaften von *C. sakazakii* das *outer membrane protein A* (OmpA) eine entscheidende Rolle spielt. OmpA ist nicht nur für die Invasion in die Darmendothelzellen, sondern auch für die Invasion in mikrovaskuläre Endothelzellen im ZNS (Smith *et al.*, 2007) und für den Weitertransport über die Blutbahn in andere Organe wie Milz oder Leber von großer Bedeutung (Kim *et al.*, 2010). OmpA bindet an die Fibronektinrezeptoren der Zelloberfläche und ermöglicht so die Invasion des Keims. Analog dazu wurde für OmpA-Deletionsmutanten im Vergleich zum *Cronobacter*-Wildstamm *in vitro* eine Reduzierung der Invasionsrate in verschiedene Zelllinien um mehr als 80 % beobachtet. (Nair *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu blieb die Adhäsionsfähigkeit von OmpA-Mutanten erhalten und ähnelte der des Wildtyp-Stamms. Mittal *et al.* (2009) konnten zeigen, dass sowohl OmpA-Mutanten als auch Stämme mit intaktem OmpA-Protein von dendritischen Zellen aufgenommen werden, nur letztere jedoch in der Lage sind, in dendritischen Zellen zu überleben und sich intrazellulär zu vermehren. OmpA spielt also auch eine wesentliche Rolle in der Umgehung der primären Immunantwort.

LPS ist als Virulenzfaktor zahlreicher anderer Gram-negativer Bakterien bekannt. Zum einen erhöht es die Durchlässigkeit der Darm-Blut- und der Blut-Hirn-Schranke durch Lockerung der zellulären *tight junctions* (Townsend *et al.*, 2007), zum anderen führt das durch Lyse der Bakterien freigesetzte Lipid A zum Auftreten starker Entzündungsreaktionen, mitunter sogar zur Sepsis (MacLean *et al.*, 2009a).

3.3. Stressbedingte Adaptationsmechanismen

Cronobacter spp. zeigen im Vergleich zu anderen *Enterobacteriaceae* gegenüber verschiedenen Stressbedingungen wie bspw. Hitze, Austrocknung und saurem Milieu eine hohe Tenazität. Verschiedene Studien, die sich mit der Hitzetoleranz dieses Keims beschäftigten, kamen allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen. Laut Nazarowec-White & Farber (1997a) ist *C. sakazakii* einer der hitzeresistentesten Organismen. Breeuwer *et al.* (2003) stuften die Hitzetoleranz ähnlich wie die von anderen *Enterobacteriaceae* ein und damit deutlich niedriger als zuvor angenommen. Laut Osaili *et al.* (2009) überlebt *Cronobacter* eine Pasteurisierung nicht und die Verwendung von 70 °C heißem Wasser wird für die Zubereitung von PIF als sicher angesehen (WHO/FAO, 2007).

Barron & Forsythe (2007) konnten zeigen, dass *Cronobacter*-Stämme nach einer Lagerung von bis zu 2,5 Jahren in PIF noch nachweisbar und lebensfähig sind und führten diese Beobachtung auf das Vorhandensein einer Kapsel bzw. von extrazellulärem Polysaccharid (EPS), welches an die Bakterienzelle locker angelagert ist, zurück. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber Trockenheit und osmotischem Stress findet sich auch auf genetischer Ebene wieder. So konnten Joseph *et al.* (2012b) für alle untersuchten *Cronobacter* spp. Gene identifizieren, die für die Aufnahme von schützenden Substanzen wie Glycin, Betain und Trehalose kodieren. Auch Grim *et al.* (2013) fanden im *Cronobacter core* Genom verschiedene in Operons organisierte Gene für die Biosynthese von extrazellulärer Matrix wie bspw. bakterieller Cellulose (*bcs*- und *yhi*-Gene), Colansäure-EPS, Kapsel-EPS und Amyloidfasern, den sog. Curli GR 55.

4. Nachweisverfahren für *Cronobacter sakazakii*

4.1. Klassische mikrobiologische Verfahren

Die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel legt die Referenzmethode ISO/TS 22964 für die Überprüfung von getrockneter Säuglingsnahrung auf das Vorhandensein von *Cronobacter* spp. fest. Dabei erfolgt zuerst eine nicht-selektive Voranreicherung der Probe (1:10) in gepuffertem Peptonwasser (GPW) für 20 h bei 37 °C. Für die folgende Selektivanreicherung wird aus der Voranreicherung Material (1:100) in modifizierte Laurylsulfat-Tryptose (mLST) Bouillon mit Zusatz von Vancomycin übertragen und für 24 h bei 44 °C inkubiert. Für den Nachweis werden davon 100 µl auf chromogene selektive Nährböden, bspw. ESIA (*Enterobacter sakazakii* isolation agar) oder CCI (chromogenic *Cronobacter* isolation) Agar, ausplattiert und für weitere 24 h bei 44 °C inkubiert. Die von *Cronobacter* spp. produzierte alpha-Glukosidase kann das im Nährboden enthaltene Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranosid hydrolysieren, wodurch die Kolonien eine charakteristische blau-grüne Färbung annehmen. Diese präsumtiven Kolonien werden wiederum auf TSA (Trypton-Soja-Agar) ausplattiert und ein weiteres Mal für 48 h bei 25 °C inkubiert. Abschließend erfolgt die Bestätigung anhand biochemischer Reaktionsmuster, z.B. mit ID 32E oder API 20 E (bioMérieux). Laut der Verordnung (EU) Nr.

365/2010 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/200 darf *Cronobacter* spp. in 30 Proben à 10 g nicht nachweisbar sein.

Eine weitere anerkannte Referenzmethode ist diejenige der US-amerikanischen Food and Drug Administration (U.S-FDA). Einer Voranreicherung folgt eine selektive Anreicherung in *Enterobacteriaceae* enrichment (EE) Medium, bestehend aus gepufferter Glucose-Brilliantgrün-Galle Bouillon. Daraus wird Material auf selektiven, aber nicht *Cronobacter* spp. spezifischen VRBG (violet red bile glucose) Agar ausgestrichen. Fünf verdächtige violette Kolonien mit Galle-Präzipitationshof werden auf TSA ausplattiert. Wiederum verdächtige Kolonien mit einer gelben Pigmentierung werden mit Hilfe von API 20 E bestätigt. Diese Methode wurde inzwischen um einen weiteren Schritt ergänzt. Dabei wird parallel zur konventionellen, rein kulturellen Methode, aus der Voranreicherung in GPW Material für das Screening mittels einer real-time PCR entnommen (Seo & Brackett, 2005).

Iversen *et al.* (2008a) entwickelten eine alternative Screeningmethode unter der Verwendung von CSB (*Cronobacter* screening broth) und mDFI (modifizierter Druggan, Forsythe, and Iversen) Agar, um negative Proben bereits innerhalb von 48 h identifizieren zu können. Bei dem Vergleich dieser Methode mit den beiden Referenzverfahren ISO/TS 22964 und FDA, konnte sowohl mit der neuen CSB-Methode als auch mit der ISO-Referenzmethode, abhängig von dem verwendeten chromogenen Agar, jeweils bis zu 100 % der kontaminierten Produktproben detektiert werden. Die FDA-Methode war allerdings nur für 52,2 % der Proben positiv.

4.2. Molekularbiologische Nachweisverfahren

Um die benötigte Zeit für den Nachweis von *Cronobacter* spp. deutlich zu reduzieren, wurden zahlreiche molekularbiologische Nachweisverfahren etabliert. So ist inzwischen auch eine auf TaqMan-Sonden basierende real-time PCR (Seo & Brackett, 2005) Teil der FDA-Referenzmethode (Chen *et al.*, 2009). *Cronobacter* spp. können außerdem mit kommerziell erhältlichen real-time PCR Kits detektiert werden. Fricker-Feer *et al.* (2011) verglichen in einer Studie drei Kits verschiedener Hersteller für den Nachweis von *Cronobacter* spp.:

- BAX® System PCR Assay für *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.)(DuPont, Qualicon, Wilmington, USA),
- Assurance GDS® for *Cronobacter* (BioControl, Bellvue, USA) und

- foodproof® *Enterobacter sakazakii* Detection Kit (Biotecon Diagnostics, Potsdam, Deutschland).

Mit allen drei Kits sollten 21 Target- und 21 non-Target-Stämme jeweils als Reinkultur bzw. in PIF-Anreicherungsmedien analysiert werden. Sowohl das Assurance GDS® als auch das foodproof® Kit waren 100% spezifisch für *Cronobacter*, allerdings sind für letzteren Test zusätzliche Arbeitsschritte für eine DNA-Präparation notwendig. Der BAX® Test konnte nicht alle *Cronobacter* Spezies detektieren und wies zusätzlich eine Reaktion mit einem *E. cloacae* Stamm auf. Zusätzlich zu real-time PCR Methoden steht auch eine ganze Reihe von konventionellen oder multiplex PCR-Verfahren, mit denen *Cronobacter* spp. auf Genus-, Spezies- und Serotypebene identifiziert werden können, zur Verfügung (Iversen *et al.*, 2007b, Stoop *et al.*, 2009, Yan & Fanning, 2015).

4.3. Immunchemische Nachweisverfahren

Aufgrund des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwandes und der zum Teil unzuverlässigen Ergebnisse durch kulturelle und molekularbiologische Nachweisverfahren, wurden verschiedene alternative, Antikörper-basierte Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* beschrieben. Hochel & Škvor (2009) konnten in einem auf polyklonalen Antikörpern (pAks) basierenden indirekten EIA zwei Stämme (*C. sakazakii* CNCTC 5739T und *C. sakazakii* CNCTC Eb 34/8) mit einer Nachweisgrenze zwischen $0,6 \times 10^5$ CFU/ml und $3,4 \times 10^5$ CFU/ml detektieren, je nachdem ob die pAks gegen hitzelabile oder hitzestabile Komponenten der Bakterien gerichtet waren. Mit anderen Stämmen konnte keine Reaktivität nachgewiesen werden. Park *et al.* (2012) entwickelten zwei pAks (Kaninchen IgG und Huhn IgY) und etablierten damit ein Sandwich EIA-System für den Nachweis von *C. muytjensii*. Die Nachweisgrenze für zwei getestete Stämme, *C. muytjensii* ATCC 51329 und *C. muytjensii* CDC 3523-75, lag bei 2×10^4 KbE/ml. Xu *et al.* (2014) etablierten einen weiteren auf pAks basierenden indirekten EIA für den Nachweis von *Cronobacter* spp.. Mit einer Nachweisgrenze im Bereich von 10^5 KbE/ml war die Sensitivität vergleichbar mit der des indirekten EIAs von Hochel & Škvor. Xu *et al.* (2014) verwendeten zum ersten Mal mAks, um in Kombination mit pAks einen Sandwich EIA für den spezifischen Nachweis von *C. sakazakii* zu etablieren. Bei den vier getesteten Stämmen lag dabei die Nachweisgrenze mit bis zu 2×10^4 KbE/ml etwas niedriger als bei den indirekten EIA-Verfahren. Kleinsteuber (2015) generierte

und charakterisierte mehrere, z.T. serotypspezifische mAks gegen *C. sakazakii* und *C. turicensis* und schuf somit die Grundlage für die Etablierung hochempfindlicher und spezifischer immunchemischer Nachweisverfahren. In indirekten EIA-Verfahren konnten *C. sakazakii*-Stämme vom Serotyp O1 (bspw. mit dem mAk 1C4) im Bereich von 10^5 - 10^7 KbE/ml noch nachgewiesen werden. Für den *C. turicensis*-Stamm MHI 21026 (Serotyp O1) lag die Nachweisgrenze unter Verwendung des mAks 2G4 bei ca. 10^4 KbE/ml.

Aufgrund der schnellen und einfachen Durchführung von immunchemischen Nachweisverfahren, sind eine Vielzahl von Nachweiskits für verschiedene pathogene Mikroorganismen, Sporen und Toxine kommerziell verfügbar (Bolton *et al.*, 2000, Law *et al.*, 2015). Für *C. sakazakii* stehen solche Nachweisverfahren noch nicht zur Verfügung.

4.4. Apparative Nachweismethoden

Apparative Nachweisverfahren zeichnen sich in der Regel durch zuverlässige Ergebnisse bei geringem zeitlichem Aufwand aus.

Die VIDAS® (VITEK immuno diagnostic assay system) Geräte (bioMérieux) sind multiparametrische Immunoassay-Systeme, die auf dem Prinzip des sensitiven *enzyme linked fluorescent immunoassay* beruhen. Der gesamte Nachweis und die Auswertung werden vollautomatisiert durchgeführt. Ein Kit für den Nachweis von *Cronobacter* spp. wurde bereits beschrieben, ist allerdings bislang nicht kommerziell verfügbar (Yan & Fanning, 2015).

Javurková *et al.* (2012) beschrieben die Anwendung der “Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF-MS). Dabei erfolgt zuerst eine Anreicherung der Proben in mLST und das Ausplattieren auf ESIA-Platten, bevor verdächtige Kolonien analysiert werden. Eine kristalline Probe, bestehend aus geringen Mengen des Keimmaterials, eingebettet in einem Überschuss an Matrix, wird mittels Laserpulsen angeregt. Dadurch werden die Analytmoleküle (hoch konservierte ribosomale Proteine) aus der Matrix gelöst und schonend ionisiert. Anhand der unterschiedlichen Flugzeiten (*time-of-flight*) und dem sich daraus ergebenden Massenspektrum, können Mikroorganismen schließlich anhand einer Datenbank identifiziert werden.

VIT (vermicon identification technology) ist ein kommerziell erhältliches Detektions- und Identifikationssystem, welches auf der Markierung spezifischer Regionen der ribosomalen RNA mittels fluoreszierender Gensonden basiert. Nach entsprechender Behandlung, können lebende fluoreszierende *C. sakazakii*-Zellen in einem Epifluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Lehner *et al.*, 2006).

III. PUBLIKATION

Simultaneous Rapid Detection and Serotyping of *Cronobacter sakazakii* Serotypes O1, O2 and O3 Using Specific Monoclonal Antibodies

Eva J. Scharinger, Richard Dietrich, Ina Kleinsteuber, Erwin Märtlbauer, and
Kristina Schauer

Applied and Environmental Microbiology

Online ISSN: 1098-5336

DOI: 10.1128/AEM.04016-15

Received: December 16, 2015; Accepted: January 31, 2016

Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-
Maximilians-Universität, Schönleutnerstrasse 8, 85764 Oberschleißheim,
Germany

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii is a foodborne pathogen associated with rare but often lethal infections in neonates. Powdered infant formula (PIF) represents the most frequent source of infection. Out of the identified serotypes (O1-O7), particularly O1, O2 and O3 are often isolated from clinical and from PIF samples. Serotype-specific monoclonal antibodies (mAbs) suitable for the application in enzyme immunoassays (EIAs) to rapidly detect *C. sakazakii* have not yet been developed. In this study, we created specific mAbs with the ability to bind to *C. sakazakii* of the serotypes O1, O2 and O3. The characterization by indirect EIAs, immunofluorescence, motility assays and immunoblot, identified lipopolysaccharide (LPS) and exopolysaccharide (EPS) as the antigenic determinants of the mAbs. The established sandwich EIAs were highly sensitive and were able to detect colony forming units (CFU) of between 2×10^3 and 9×10^6 CFU/ml. Inclusivity tests confirmed that 93% of serotype O1-strains, 100% of O2-strains and 87% of O3-strains could be detected at low cell counts. No cross-reactivity with more than 100 strains of *Cronobacter* spp. and other *Enterobacteriaceae* was observed, except for *C. sakazakii* serotype O3 and *C. muytjensii* serotype O1. Moreover, the sandwich EIAs detected *C. sakazakii* in PIF samples artificially contaminated with 1 - 10 bacterial cells per 10 g, after 15 hours of pre-enrichment. The use of these serotype specific mAbs not only allows reliable detection of *C. sakazakii* strains, but also enables simultaneous serotyping in a simple sandwich EIA method.

INTRODUCTION

Cronobacter spp. are Gram-negative, opportunistic food-borne pathogens of the family *Enterobacteriaceae* that cause rare but severe infections in patients of all age groups. In adults, *Cronobacter* infections are often associated with nosocomial infections causing pneumonia, septicemia, wound infections or osteomyelitis while causing an invasive disease in young infants and neonates (1-4). Among the seven identified species, *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. condimenti* and *C. universalis* (5-8), *C. sakazakii* plays a prominent role due to life-threatening infections in neonates

(9-11). Clinically manifested infections present as necrotizing enterocolitis, sepsis and meningitis and a mortality rate as high as 80% (1, 12, 13). Although *C. sakazakii* has been isolated from a variety of different plant- and animal-based food products (14, 15), the presence in powdered infant formula (PIF) seems crucial for the infection of neonates (9, 12, 16). According to an established O-antigen serotyping scheme based on rabbit antisera and a PCR-based serotyping method (17-21), seven serotypes (O1-O7) have been identified for *C. sakazakii*. Serotypes O1 and O2 seem to be most prevalent in PIF samples as well as in clinical cases, whereas serotype O3 could be isolated quite frequently from PIF but not as often from clinical cases. (19, 22-24).

Today, the contamination of PIF by *C. sakazakii* is being detected using conventional microbiological methods. Optimized procedures for the isolation and identification of *Cronobacter* spp. (ISO/TS 22964 I IDF/RM 210:2006) have been published by the International Standards Organization (ISO) and the International Dairy Federation (IDF). However, these methods are very laborious and the isolation and identification of *C. sakazakii* can take up to 6 days. In addition, a rapid detection method combining real-time PCR, chromogenic agars, and biochemical tests has been published and is being recommended by the U.S.-FDA (Food and Drug Administration) (25). All reference detection methods are based on the identification of presumptive colonies with characteristic pigmentation. These criteria have been shown to be unreliable, since several pathogens of other genera grow as presumptive *Cronobacter* colonies, whereas some *Cronobacter* spp. isolates fail to grow on chromogenic agar (*Enterobacter sakazakii* isolation agar, ESIA or Chromogenic *Cronobacter* Isolation Agar, CCI) or do not exhibit yellow colony pigmentation on tryptic soy agar (TSA) (26). In the need for a reliable and inexpensive rapid detection method, several PCR-based protocols for the identification of *C. sakazakii* at the genus, species and serotype level have been established (27). Despite the rapidity, some molecular methods lack specificity, depending on the chosen primers (22, 28). The recent reassignment of *C. sakazakii* serotypes O5 and O6 to *C. malonaticus* highlights the unreliability of PCR-based serotyping for detection of all sequence-based variations of the O antigen of *C. sakazakii* (21, 22, 29). Additionally PCR methods may not be convenient for smaller laboratories, since they require expensive equipment and highly trained employees.

Therefore, various attempts for the detection of *Cronobacter* based on immunochemical methods have been made, including indirect enzyme immunoassay (EIA) using mAb and sandwich EIA using polyclonal rabbit or chicken antibodies. These assays allow the detection of *Cronobacter* spp. or of *C. sakazakii*, regardless of the serotype (30-32).

Due to lack of availability of high-affinity mAbs, until now, there is no rapid detection method available for the individual serotypes of *C. sakazakii* (28). The objective of this study was to develop highly sensitive mAbs reactive with *C. sakazakii* serotypes O1, O2 and O3 respectively in order to establish sandwich EIAs for the specific detection and identification of these serotypes. LPS as the most variable and abundant (70% of outer membrane) component of the bacterial surface (33, 34) is highly immunogenic and is the best target for the development of specific antibodies. For this reason, in contrast to previous methods, not whole-cell preparations, but cell-free lipopolysaccharide (LPS) preparations were used for immunization of mice. In order to evaluate the specificity of the produced mAbs, a large selection of *Cronobacter* spp. and other *Enterobacteriaceae* was screened in indirect EIAs. The ability of the established sandwich EIAs to specifically detect *C. sakazakii* was confirmed by directly analyzing artificially contaminated PIF samples after enrichment in buffered peptone water. These new assays show great promise to replace time-consuming culturing methods and, in parallel, represent the first step towards establishing a monoclonal antibody based *C. sakazakii* serotyping scheme.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions.

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1 (page 49 ff.). In general, all strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with constant agitation. For solid media, 15 g/liter agar was added. For the use in indirect enzyme immunoassay (EIA) as coating antigen, bacteria were harvested from 50 ml overnight culture by centrifugation at 4600×g for 20 min at 4°C, washed with 15 ml sterile phosphate buffered saline (PBS) and finally resuspended in 2 ml PBS. Preparations were stored at –20°C until further use.

Strains used in sandwich EIA to determine the limit of detection (LOD) were prepared as glycerol stocks (final concentration 15% (v/v) in PBS), and stored at -80°C . To determine the number of colony forming units (CFU), 10-fold serial dilutions of bacterial cells were plated on LB agar plates.

Identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp.

The isolation of genomic DNA as template for PCR was carried out according to standard protocols (35). To identify *Cronobacter* strains at genus, species and serotype levels, the proposed schema for *Cronobacter* spp. (28) was applied using molecular detection techniques: an alpha-glucosidase based PCR assay was performed to confirm the bacterial genus (36) and the species of the *Cronobacter* strains were identified using *rpoB* and *cgcA* as the gene targets for the PCR amplification (7, 37). Only strains which were confirmed as *C. sakazakii* were subjected to following multiplex-PCR to identify the serotype. PCR conditions and primers were applied as described previously (20). For serotyping of the other *Cronobacter* species, conditions and primers were used as described by Jarvis *et al.* (18).

Immunogen preparation, immunization and hybridoma cell production.

Immunizations of mice for generating monoclonal antibodies were conducted in compliance with the German Law for Protection of Animals. Study permission was obtained by the Government of Upper Bavaria (permit number 55.2-1-54-2531.6-1-08). For each of the serotypes O1-O3 one *C. sakazakii* strain (Table 1, page 49 ff.) was randomly chosen to prepare cell-free immunogenic extracts for the immunization of three different groups of mice. The preparation of protein and LPS extracts by treating bacterial strains with polymyxin B-sulfate as well as the immunization of female mice [BALB/c strain and a hybrid strain of BALB/c \times (NZW \times NZB)] was conducted as described before (38). Fusion of splenocytes and myeloma cells X63-Ag8.653 was performed as published by Dietrich *et al.* (39). The culture supernatant of the hybridoma cells was screened for serotype-specific antibodies by a standard EIA protocol (38, 40) with concentrated bacterial preparations, serving as the solid phase. Positive clones were separated by limiting dilution and subsequently mass produced in Mini-Perm (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) or Cell line bioreactors (INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Switzerland). The immunoglobulin subtype of the mAbs was determined

by using mouse mAb-isotyping reagents purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The isolation and purification of mAbs was performed by affinity chromatography on protein A- or protein G-agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as described before (40).

Monoclonal antibody characterization.

Mass produced and purified mAbs were characterized using immunoblot analysis of LPS extracts, immunofluorescence and motility assays.

Preparation of LPS extracts, SDS-PAGE and immunoblot analysis.

LPS was isolated using the phenol-chloroform method described previously (38, 41, 42) with the following modifications. Before subjecting the cell suspension to the phenol-chloroform procedure, 25 µl proteinase K (10 µg/ml) was added and the preparation was incubated for 30 min at 55°C. The precipitated and dried extracts were dissolved in 70 µl distilled water. For SDS-PAGE analysis, the LPS preparations were mixed with XT sample buffer and reducing agent (Bio-Rad), then incubated for 10 min at 100°C and stored at -20°C upon use. 20 µl of each LPS extract was separated by SDS-PAGE and subsequently transferred to a PVDF membrane. These steps as well as the subsequent detection of bound mAb by immunoblot were performed as described earlier (38).

Immunofluorescence.

The reactivity of serotype-specific mAbs with membrane components of untreated live cells of all *C. sakazakii* serotype O1-, O2-, and O3-strains and cells of other bacteria species was tested using immunofluorescence microscopy as described by Schauer *et al.* (38).

Motility assay.

Motility assays were performed as described previously (38). Briefly, petri dishes (6 cm diameter) with LB soft agar (0.3% agar) containing the specific mAb at a concentration of 17 µg/ml were 'stab-inoculated' with 1 µl of an overnight culture in the centers and incubated upright at 37°C. The motility of the bacteria was determined by measuring the diameter of motility zone after 8 hours of incubation.

Inclusivity and exclusivity tests.

Inclusivity and exclusivity of the mAbs was determined by analyzing a broad range of bacterial strains in indirect EIA. The reactivity of 14 serotype O1 strains, 20 serotype O2 strains and 15 serotype O3 strains respectively was analyzed. In addition, a broad range of different stains including 18 *C. sakazakii* strains from the serotypes O4 and O7, 23 *Cronobacter* spp. strains as well as 20 more distantly related bacteria were analyzed (Table 1, page 49 ff.). In EIAs, bacterial preparations with a concentration of 1×10^7 CFU/ml served as the solid phase and were serially diluted in PBS. After incubating EIA plates at 4°C overnight, free binding sites were blocked with 150 µl per well of 3% caseinate-PBS for 30 min. Subsequently plates were washed (distilled water with 0.15 M NaCl and 0.02% Tween 20) and 100 µl of the mAbs were added (1 µg/ml in PBS) for 1 h. After another washing step, bound mAb was detected with 100 µl of secondary polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/HRP (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) solution (1:2,000 in 1% caseinate/PBS). Following another washing step, 100 µl/well of substrate/chromogen solution (1 mmol 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 3 mmol of H₂O₂ per liter potassium citrate buffer pH 3.9) was added and incubated for 20 min. The reaction was stopped by adding 100 µl of 1 M H₂SO₄ into each well. The absorbance was measured at 450 nm using an EIA plate reader (Ridawin, Tecan Deutschland GmbH). The absorbance data were analyzed using the Ridawin EIA calculation software (r-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany).

Establishment of an optimized sandwich EIA system.

In order to establish a sandwich EIA, the specific mAbs were conjugated using activated horseradish peroxidase (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) following the manufacturer's instructions. To define optimal working concentrations, the mAbs and the equivalent HRP-conjugated mAbs were applied in checkerboard titrations with and without *C. sakazakii* strains. To determine the limit of detection (LOD) of the assay, microtiter plates were coated with the specific mAb (10 µg/ml) in PBS at ambient temperatures overnight. Bacterial cells, live or heat-treated (121°C for 15 min), were diluted in 0.1% BSA/PBS and subsequently detected using the HRP-conjugated specific mAbs (mAb 1C4-HRP and mAb 2F8-HRP 1:1,000, mAb 1A11-HRP 1:2,000 in 1% caseinate/PBS solution). All other steps were conducted according to the indirect EIA method.

In order to achieve high absorbance values for bound *C. sakazakii* as well as lowest possible absorbance values for blank samples, various compositions of the dilution buffer for the antigen were examined, including PBS, PBS containing 0.1% BSA, PBS containing different concentrations of Tween 20 (0.5%, 1%) and PBS containing BSA as well as Tween 20.

Detection of *C. sakazakii* serotype O1, O2 and O3 in powdered infant formula.

Powdered infant formulas (PIF), in particular four initial milk formulas (from birth on) and three follow-on formulas (from 6th month on) were purchased from a local German drugstore. For each *C. sakazakii* serotype, three strains were cultivated in LB broth overnight at 37°C and plated on LB agar to determine the bacterial cell counts. To check the applicability of the developed sandwich EIA system for the sensitive detection of *C. sakazakii* in PIF, 10 g of sample were dissolved in 90 ml buffered peptone water. This mixture was artificially contaminated with 1 ml of a dilution of the *C. sakazakii* overnight culture corresponding to 1 – 10 CFU and incubated at 37°C without shaking. After 15 h, samples were directly analyzed by sandwich EIA and, in parallel, the CFU were determined according to the ISO method on Chromogenic *Cronobacter* Isolation Agar (CCI, Oxoid).

RESULTS

Identification of *C. sakazakii* serotypes.

Due to the limitation of PCR-based methods for the determination of the different variations of genomic O-antigen gene clusters of *C. sakazakii* strains, it has been proposed, that *C. sakazakii* serotypes can only reliably be determined after the strains have been identified as members of the genus *Cronobacter* and species *sakazakii*. Therefore, the genus and species of a collection of 76 strains which were previously identified as *Cronobacter sakazakii* at our institute by classical culture methods according to ISO/TS 22964 I IDF/RM 210:2006 were verified using PCR method (7, 36, 37). Thereafter, strains were serotyped using a PCR-multiplex method (18, 20). Out of 76 assumed *C. sakazakii* strains, 70 were confirmed at genus and species level to be *C. sakazakii*, while six strains belonged to the species *C. malonaticus*. The majority of strains belonged to the serotype O2 (22 strains), O3 (15 strains) and O1 (14 strains), followed by O7 (11 strains) and

O4 (7 strains). Thus serotype O1, O2 and O3 together constitute 74.3% of the *C. sakazakii* strain collection; whereas serotype O4 and O7 represent only 25.7% of all strains (Table 1, page 49 ff.). Serotypes O5 and O6 could not be detected.

Production of monoclonal antibodies.

To create serotype specific mAbs against *C. sakazakii*, three different groups of five female mice each were immunized with cell-free polymyxin-B extracts of the selected strains MHI 21001 (O1), MHI 977 (O2), and MHI 990 (O3). Almost all mice developed high specific antibody titers for *C. sakazakii*. After cell fusion, a broad range of more than 20 antibody producing hybridomas reactive with *C. sakazakii* were obtained in indirect EIAs, in which *C. sakazakii* preparations served as solid phase. In terms of specific reactivity, mAbs could be categorized into 3 groups of different reaction patterns: mAbs of the first group reacted with all serotypes of *C. sakazakii* as well as with other *Enterobacteriaceae*, while mAbs of the two other groups reacted serotype specific either with single strains (group 2) or with the vast majority (group 3) of the *C. sakazakii* strains of a certain serotype. Titers of the mAbs were determined in indirect EIA and, finally, three high antibody-producing hybridoma clones for which a serotype specific reactivity was observed (group 3) were selected for detailed characterization and the establishment of sandwich EIAs. These mAbs, all of the IgG class, were designated mAb 1C4 (reactive with serotype O1), mAb 2F8 (reactive with serotype O2) and mAb 1A11 (reactive with serotype O3) (Table 2).

TABLE 2. Characteristics and cross-reactivity of the produced mAbs.

mAb	IgG-subtype	Specificity	Target	Inclusivity ^a	Exclusivity ^b
1C4	IgG _{2a}	O1	EPS	13/14*	0/95
2F8	IgG _{2a}	O2	LPS	20/20	0/89
1A11	IgG _{2b}	O3	LPS	13/15**	2/94***

^a Number of positive results with same serotype-strains tested in indirect EIA

^b Number of positive results with different serotypes of *C. sakazakii* strains, other *Cronobacter* species, 17 *Enterobacteriaceae* strains as well as three other Gram-negative strains

* no reactivity with strain MHI 21040

** no reactivity with strain MHI 982 and MHI 21129

*** reactive with MHI 21212 and MHI 21213 (both *C. muytjensii* serotype O1)

Inclusivity and exclusivity tests.

The specificity of the produced mAbs was determined in indirect EIAs by testing the *Cronobacter* spp. collection comprising 91 strains, as well as additional strains of the *Enterobacteriaceae* family, including *Franconibacter helveticus*, *F. pulveris* and *Siccibacter turicensis*, which may simultaneously occur in the same PIF, and other Gram-negative bacteria (Table 1, page 49 ff.). Out of 15 tested *C. sakazakii* O1-strains, all strains, except *C. sakazakii* MHI 21040 (CDC 0996-77), were recognized by the mAb 1C4. MAb 2F8 showed binding to all 20 *C. sakazakii* O2-strains tested and mAb 1A11 bound to 13 out of 15 *C. sakazakii* O3-strains (no reactivity with strain MHI 982 and MHI 21129). Within the *C. sakazakii*-group, all mAbs reacted exclusively with the respective *C. sakazakii* serotype. High affinity of the mAbs is documented by the fact that even after diluting the bacterial preparations 50,000 times, absorbance values of ≥ 1.0 were obtained in the EIA. Further on, the mAbs 1C4 (O1) and 2F8 (O2) showed no cross-reactivity with other *Cronobacter* spp. strains or more distantly related bacteria (Table 2). Absorbance values for these negative strains ranged between 0.008 and 0.082 at cell counts of 1×10^7 CFU/ml. The mAb 1A11 (O3) additionally reacted with two *C. muytjensii* strains of the serotype O1.

Identification of the antigenic determinant.

In indirect EIAs, the three developed mAbs showed a strong reactivity only with the respective *C. sakazakii* serotypes suggesting that the serotype-specific antigenic determinants are represented by polysaccharides, which are components of the cell envelope of all Gram-negative bacteria and, thus, form an important structure for antigenic classification of the organism. This assumption was supported by immunofluorescence microscopy, where all three antibodies showed considerable fluorescence on the surface of all 49 tested strains (Fig. 1). Two patterns could be observed: Evenly distributed fluorescence on the surface of *C. sakazakii* serotype O2 and O3 strains (Fig. 1 B, C) was observed using mAb 2F8 (O2) and mAb 1A11 (O3). In contrast, use of mAb 1C4 for labeling *C. sakazakii* serotype O1 strains resulted in a more punctuated distribution of fluorescence (Fig. 1 A).

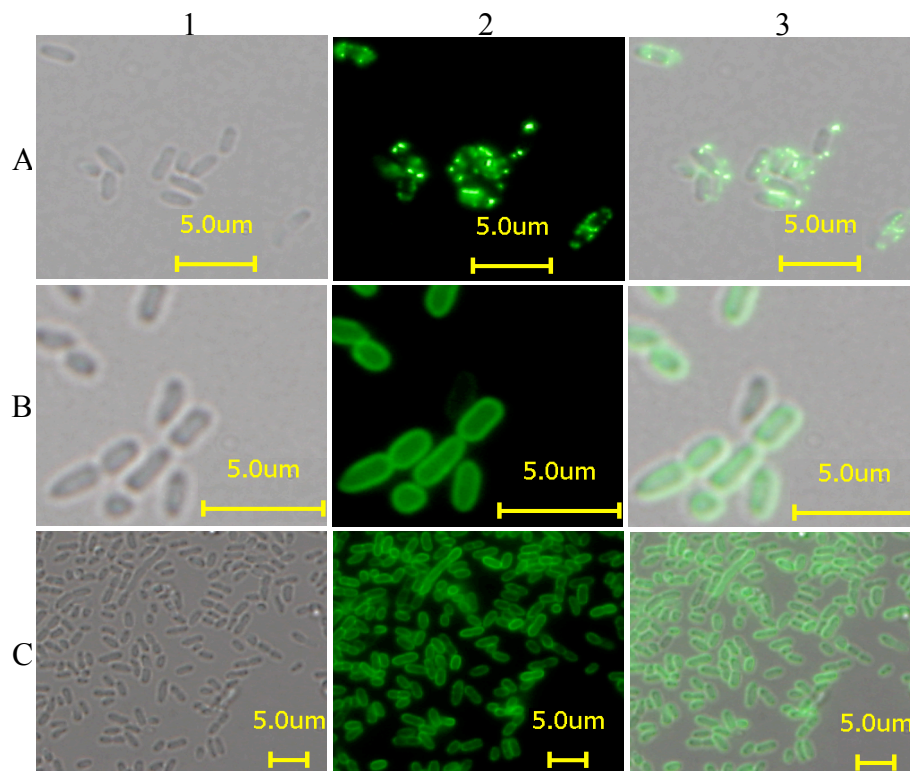


Figure 1. Microscopic analysis of live *C. sakazakii* cells by phase contrast (1), immunofluorescence (2) and overlay mode (3) using serotype specific mAbs: (A) MHI 21172 (O1) stained with mAb 1C4, (B) MHI 21032 (O2) stained with mAb 2F8, and (C) MHI 21166 (O3) stained with mAb 1A11.

Finally, immunoblotting confirmed the specificity of mAbs to a polysaccharide moiety extracted from 2 – 8 *C. sakazakii* strains from each serotype (O1-O3) (Fig. 2). All immunoblot profiles showed a ladder pattern characteristic for polysaccharides. Furthermore, the same characteristic ladder pattern was observed after proteinase K treatment of the LPS extracts, proving that proteinaceous structures are irrelevant for the antibody reactivity.

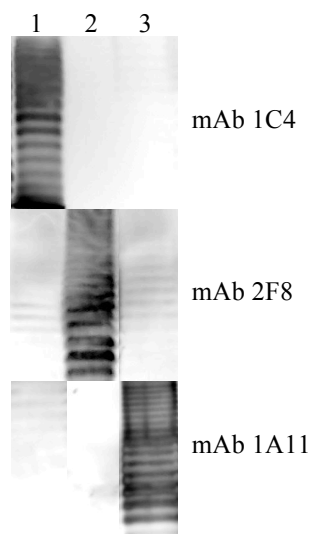


Figure 2. Reactivity of mAb 1C4, mAb 2F8 and mAb 1A11 with (lipo-) polysaccharide preparations of different serotypes of *C. sakazakii* strains. Lane 1, MHI 21011 (O1); lane 2, MHI 21029 (O2); lane 3, MHI 990 (O3).

In order to further narrow down the possible antigenic determinant and with respect to a previous publication in which a reduced flagellar motility of strains was observed after binding of LPS-specific mAb (38), the motility of *Cronobacter* cells on soft agar in presence of the mAbs was analyzed for 2 – 3 strains of each serotype (Table 1, page 49 ff.). Addition of mAbs 2F8 or mAb 1A11 to the medium inhibited the bacterial motility of strains of the O2 and O3 serotype groups, demonstrated by a significantly reduced diameter of the diffuse growth area (Fig. 3). Overall, the motility zones were reduced by 40-50% in comparison to soft agar plates without added mAbs (Fig. 3 B, C). In contrast, no effect on bacterial motility of O1 serotype strains was observed by exposure to the mAb 1C4 (Fig. 3 A).

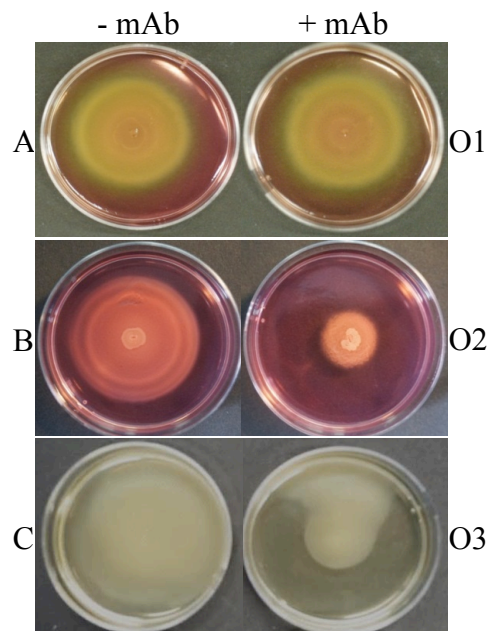


Figure 3. Swimming ability of *C. sakazakii*. Bacterial motility was assayed in soft agar without and with specific mAbs (17 µg/ml). MAb 1C4- and mAb 2F8-containing supernatants of hybridoma cells were diluted in soft agar containing 50% DMEM. Purified mAb 1A11 was added in soft agar without DMEM. Motility zones were measured after 8 h of incubation at 37°C. (A) MHI 21001 (O1), (B) MHI 21035 (O2), (C) MHI 990 (O3).

As mAb 1C4 did not affect bacterial motility, and thus, LPS seemed unlikely for being the antigenic determinant, it was tested if other polysaccharides (e.g. exopolysaccharide (EPS) or capsular polysaccharide (CPS)) might be the target of the mAb 1C4. Therefore, a previously published acapsular *C. sakazakii* MHI 975 (NCTC 11467T) strain (43) was analyzed by immunofluorescence. The same localized fluorescence signal as for all other *C. sakazakii* strains from serotype O1 was obtained. This observation led to the assumption that for this mAb not CPS but EPS, which is loosely attached to the bacterial surface, serves as antigenic determinant. Altogether, these results strongly indicate that the LPS O-specific polysaccharide chain of the *C. sakazakii* O2 and O3 serotypes (Fig. S1) as well as EPS of the *C. sakazakii* O1 serotype represent the antigens specifically recognized by mAb 1A11, mAb 2F8 and mAb 1C4 respectively.

Establishment of sandwich EIA.

As both LPS and EPS are evenly distributed on the surface of *C. sakazakii* strains, it seemed reasonable to establish sandwich EIAs for the different serotypes based on each of the available specific mAb. For this purpose, the same mAb was used both as coating and - after labeling with HRP - as detection antibody in sandwich EIA. The dilution of bacterial strains in 0.1% BSA/PBS resulted in the most stable values and was subsequently used as dilution buffer.

The lowest number of detectable bacteria (LOD) was defined as twice the absorbance (at 450 nm) of the blank value (Fig. 4), which ranged from 0.06 to 0.019. For 46 out of 49 tested strains, the sensitivity of the three serotype-specific sandwich EIAs ranged from 2×10^3 CFU/ml to 9×10^6 CFU/ml, whereas 3 strains were not detectable (Table 3).

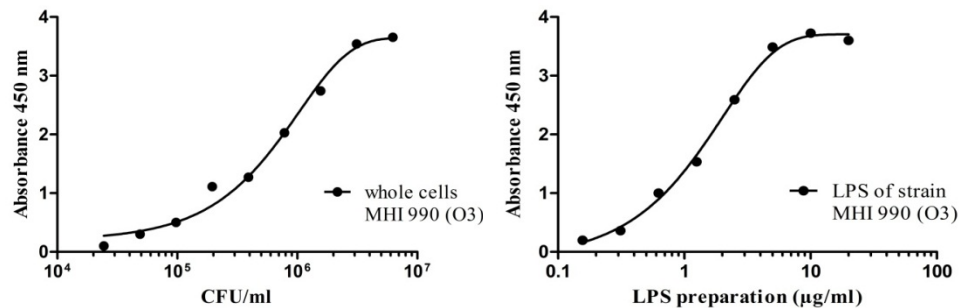


Figure S1. Reactivity of mAb 1A11 with whole cells and isolated LPS of strain MHI 990 (O3) in an indirect EIA. Both preparations were coated onto EIA plates in twofold serial dilution and subsequently probed with mAb 1A11 (2.5 µg/ml). Bound mAb was detected using secondary HRP-labeled polyclonal rabbit-anti mouse IgG (1:2000 in 1% caseinate/PBS).

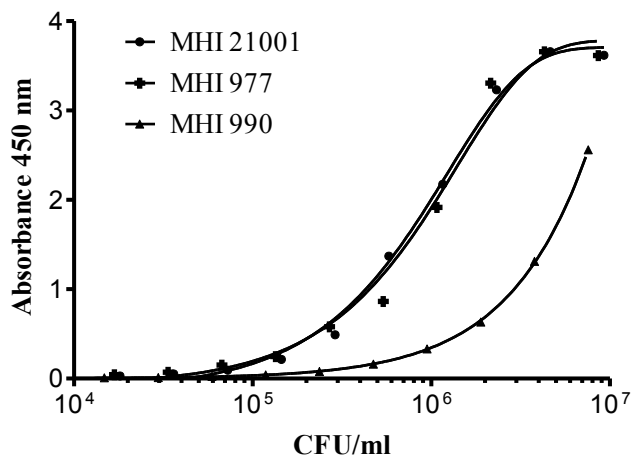


Figure 4. Sensitivity of the sandwich EIA for the detection of the *C.sakazakii* strains MHI 21001 (O1), MHI 977 (O2) and MHI 990 (O3). MAbs 1C4, 2F8, and 1A11 respectively (10 µg/ml) served as solid phase. Bacteria were enriched overnight in LB broth at 37°C and subsequently detected in serial dilutions with 1C4-HRP, 2F8-HRP (1:1,000) and 1A11-HRP (1:2,000) respectively.

TABLE 3. Detection limits (LOD) of *C. sakazakii* strains in sandwich EIAs

Detection limit (CFU/ml) Strain number (MHI) ¹	
1C4	
(O1)	
9×10^3	21011
$2 - 7 \times 10^4$	21001*, 975, 21039, 21028, 21086, 21008
$1 - 3 \times 10^5$	21012, 21038, 996, 21000, 21172, 21030
n.d.	21040
2F8	
(O2)	
$2 - 9 \times 10^3$	21041, 21003, 998, 977*, 995, 21004, 21035
$1 - 6 \times 10^4$	21037, 21010, 21042, 21098, 999, 21009, 21029, 21122, 21027, 21108, 21032
$1 - 2 \times 10^5$	988, 989
1A11	
(O3)	
$1 - 9 \times 10^4$	21036, 21006, 21131, 21014, 21166, 21168, 21167, 21007, 990*, 21013, 21130
2×10^5	21169
9×10^6	21132
n.d.	982, 21129

1: In order of lowest to highest detection limit.

*: Strains used for immunization of mice

In detail, one serotype O1- strain (MHI 21011) was detectable at a cell count of 9×10^3 CFU/ml. For 6 strains of this serotype, specific detection limits of $2 \times 10^4 - 7 \times 10^4$ CFU/ml could be realized. Six strains showed slightly higher detection limits between 1×10^5 and 3×10^5 CFU/ml. Only one strain (MHI 21040) was not detectable and showed an absorbance value of 0.02 at a cell count of 1.4×10^6 CFU/ml. In comparison to the serotype O1 specific sandwich EIA, the serotype O2 assay showed even higher sensitivity: seven strains were still detectable at cell counts between $2 \times 10^3 - 9 \times 10^3$ CFU/ml and 11 strains had detection limits ranging from 1×10^4 to 6×10^4 CFU/ml. Only for 2 strains a slightly higher LOD of $1 - 2 \times 10^5$ CFU/ml was observed. For the majority of strains of the O3 serotype, detection limits ranged from 1×10^4 CFU/ml to 9×10^4 CFU/ml. Two strains were just detectable at cell counts of 2×10^5 CFU/ml and 9×10^6 CFU/ml, respectively, while two further strains showed no reactivity in the assay.

Application of the sandwich EIA for the detection of *C. sakazakii* in powdered infant formula.

In order to determine the applicability of the established sandwich EIA, the effect of different PIF on the EIA performance was analyzed in preliminary experiments. For this purpose, 10 g of seven PIF samples, including four different initial formulas (from birth onward) and three follow-on formulas (from 6th month on) were diluted in 90 ml buffered peptone water and analyzed by the developed EIAs (serial twofold dilutions in PBS/0.1% Tween 20). While undiluted negative samples reacted slightly positive in the EIAs, for tenfold diluted samples the absorbance values ranged from 0.02 to 0.08, and were thus nearly identical to those obtained for pure buffer solutions. Therefore, the general cut-off (background) of the assays was set at a value of 0.1.

To investigate whether PIF as matrix has a negative effect on growth of *C. sakazakii* and the determined sensitivity of the sandwich EIA, in a preliminary experiment, 10 g of one of the initial milk formulas was artificially contaminated with 10 CFU of *C. sakazakii* MHI 997 and enriched at 37°C. After 15 h, both the CFU was determined by plating 100 µl on CCI agar and in parallel the enrichment broth was analyzed in serial dilution by sandwich EIA. Under these conditions the broth reacted positive in the EIA up to a dilution of 1:51,200, which corresponded to a bacterial cell count of 3×10^4 CFU/ml. These values were comparable to previously determined LOD of 7×10^3 CFU/ml buffer (Table 3) and underline the

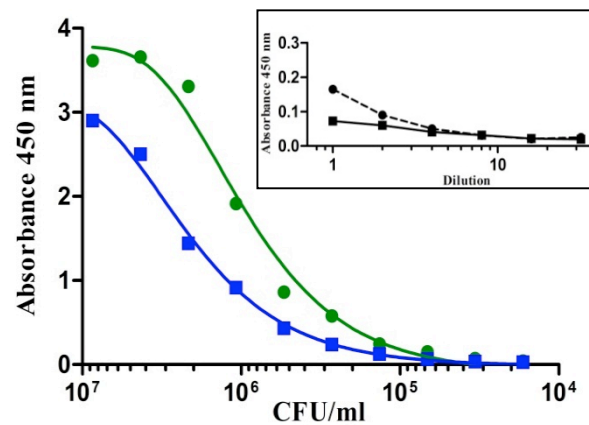


Figure 5. Evaluation of the established O₂-specific sandwich EIA for the analysis of *C. sakazakii* in PIF. Comparison of the detection limit of strain MHI 977 (O₂) in pure bacterial preparation in PBS (green line) and in enriched 10% PIF broth (blue line). Inlet: Absorbance values of buffered peptone water (black dashed line), and 10% PIF/buffered peptone water (black solid line) without *Cronobacter* (background). All samples were analyzed in twofold serial dilutions in PBS/0.1% Tween20 and probed with mAb 2F8 (10 µg/ml) and 2F8-HRP (1:1,000 in 1% caseinate/PBS).

robustness of the developed EIA (Fig. 5).

To prove the applicability of the developed sandwich EIA for the reproducible and sensitive detection of *C. sakazakii*, 10 g of commercially available PIF, dissolved in 90 ml buffered peptone water, were artificially contaminated each with a strain of the serotypes O₁, O₂ and O₃. The viable-cell counts of the inocula used for PIF samples indicated that samples were spiked with 1 to 10 cells per 10 g milk powder (Fig. 6) prior to enrichment according to the ISO reference method for up to 18 h at 37°C. To determine the required incubation time for detection, aliquot samples of the contaminated PIF were taken after 5 h, 8 h, 11 h and 15 h and analyzed by sandwich EIA. In all three assays *C. sakazakii* was reliably detected after 15 h and in some cases already after 11 h enrichment. Longer incubation did not improve test results. Samples could be diluted ranging from 1:20 up to more than 1:5,120, depending on the strain and the bacterial cell counts applied for contamination of the PIF samples (Fig. S2). At a tenfold dilution, all samples except for one sample (MHI 21011, artificially contaminated with 1 CFU per 10 g) were positive (absorbance values > 0.1) with measured signals ranging from 0.275 to 3.5 (Fig. 6).

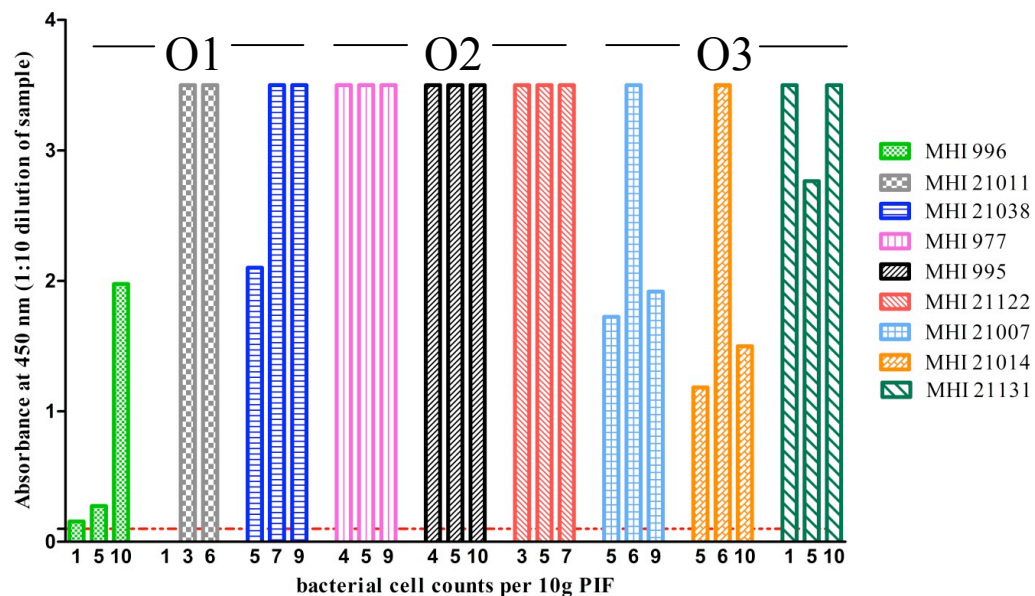


Figure 6. Detection of *C. sakazakii* serotypes O1, O2 and O3 in PIF samples. For each serotype 3 strains were used to artificially contaminate 10 g of PIF with bacterial cell counts ranging from 1 – 10 CFU. After 15 h of enrichment, serially diluted samples were directly analyzed in the sandwich EIAs. Experiments were conducted as triplicates as indicated by columns. The absorbance values were dependent on the amount of *C. sakazakii* used for the contamination. Absorbance values for tenfold diluted samples ranged from 0.156 to 3.5. The cut-off value (absorbance ≤ 0.1) of the EIAs is indicated by the dashed red line.

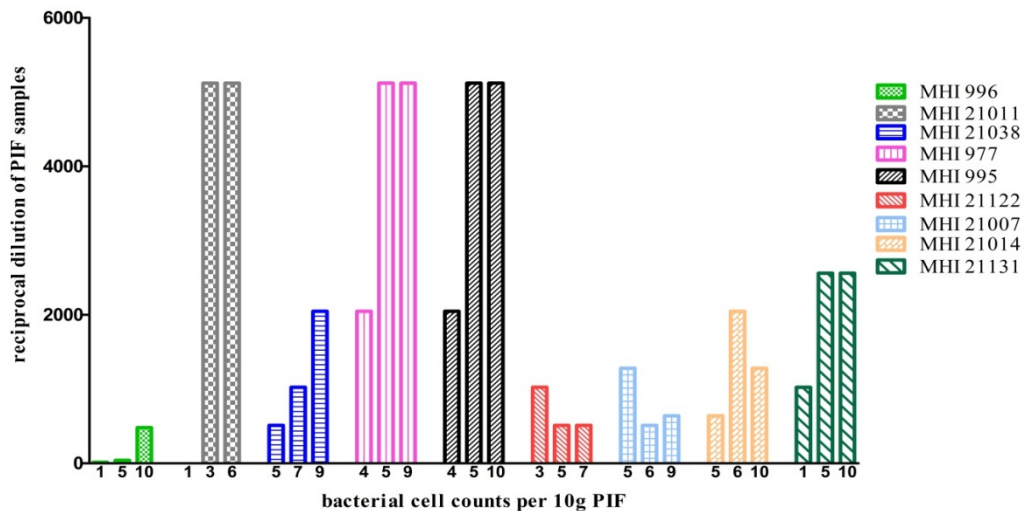


Figure S2. Analysis of enriched PIF samples, which were artificially contaminated with *C. sakazakii* serotypes O1, O2 and O3. For each serotype 3 strains were used to contaminate 10 g of PIF with bacterial cell counts ranging from 1 – 10. After 15 h of enrichment, serially diluted samples were directly analyzed in the sandwich EIAs. The reciprocal dilution at the detection limit of the samples ranged from 1:20 to 1:5,120. Experiments were conducted as triplicates as indicated by columns.

DISCUSSION

C. sakazakii is an opportunistic pathogen causing life-threatening infections in neonates. The pathogen can be isolated from clinical, environmental and a wide range of food sources, predominantly from PIF and its associated production environments (21, 28, 44, 45). In general, the majority of *C. sakazakii* isolates belong to the serotypes O1 and O2 (22), followed by serotype O3, O4 and O7 (19-22, 28, 46). The reported distribution of *C. sakazakii* serotypes agrees with the findings of this study: Of the 70 *C. sakazakii* isolates of our strain collection *C. sakazakii* O2 (22 isolates, 31.43%) was detected predominantly, followed by serotype O3 (16 isolates, 22.86%) and O1 (14 isolates, 20%). Blažková *et al.* (2015) reported that only *C. sakazakii* serotypes O1, O2 and O4 could be isolated from clinical cases, while *C. sakazakii* serotypes O3 and O7 were not found, even though their occurrence in PIF samples has been described (22). In contrast, Yan *et al.* reported in a recently published study (24, 28), that *C. sakazakii* serotypes O1-O3 are the most common serotypes in clinical isolates. The distribution of *C. sakazakii* serotypes in clinical isolates allows the assumption that some *C. sakazakii* serotypes might be more pathogenic than others. Therefore it is important for epidemiological studies to not only identify the genus and species but also the serotype of the causative agent. Until now, serotype specific mAbs recognizing the O-specific polysaccharide chain of LPS and reacting with untreated live cells have only been described for the *Cronobacter turicensis* serotype O1 (38). In general, LPS and various other polysaccharides, such as CPS and EPS, have been identified as major virulence factors. They contribute to capsule and biofilm formation of Gram-negative pathogens (47, 48) and are essential for the persistence of *C. sakazakii* in harsh environments (29). The highly variable polysaccharide structures are strong immunogens showing a high degree of antigenic variation and are often targets for producing antibodies. However, only limited reports are available on the production of high-affinity mAbs against LPS and their application in sensitive and robust sandwich EIAs for the detection of food-borne pathogens (49, 50). Westerman *et al.* (1997) presented the production and characterization of specific mAbs for the LPS of *E.coli* O157 as a valuable tool for its rapid detection. An EIA for the detection and serogroup differentiation of *Salmonella* spp. using o-factor-specific mAb conjugates and a broad-reactive mAb, specific for the outer core oligosaccharide of *Salmonella* LPS, was presented by Ng *et al.* (1996). For *C. sakazakii* a sandwich EIA based

on mAbs and polyclonal antibodies (pAbs) has been established previously (31), presumably reactive with heat-stable LPS of one of the serotypes. However, the target of the antibodies as well as the serotype of the tested strains was ultimately not identified.

In order to develop a mAb-based method to detect each of the *C. sakazakii* serotypes O1-O3, mAbs 1C4 (O1), 2F8 (O2) and 1A11 (O3) were generated and characterized. The mAbs 1C4 and 2F8 reliably recognized the respective *C. sakazakii* serotype and showed no cross-reactivity with other *Cronobacter* spp. or other members of the *Enterobacteriaceae* family. In contrast, mAb 1A11 exhibited considerable cross-reactivity with *C. muytjensii* serotype O1-strains (E769, E888). This represents an expected result as it has been previously shown that this serotype shares an identical LPS biosynthetic operon with *C. sakazakii* serotype O3 (18, 51, 52). Accordingly, for mAb 1A11 (O3), the O-specific polysaccharide chain of LPS was identified as the antigenic determinant by immunoblot.

Treatment of live bacteria with the LPS-specific mAbs 1A11 and 2F8 resulted in a reduced flagellum-based motility, which was also observed in a previous study for a mAb targeting *C. turicensis* LPS (38). In contrast, mAb 1C4 (O1) displayed a localized fluorescence signal (foci) on the bacterial surface of *C. sakazakii* serotype O1 and did not inhibit bacterial motility. However, a characteristic polysaccharide ladder pattern was observed in immunoblot, suggesting that the EPS moiety of the cell envelope could be the possible antigen for mAb 1C4. The mAb 1C4 reacted with all tested *C. sakazakii* serotype O1-strains except MHI 21040 (Table 2). This strain is likely to possess changes in its cell surface composition, because in another yet unpublished study, only this strain was unable to activate MAP kinases such as ERK, p38 and JNK in human colon epithelial cells (Caco-2) (K. Schauer, unpublished data). Possibly, an altered LPS composition is also the reason for the missing reactivity of mAb 1A11 with the O3 serotype strains MHI 982 and MHI 21129. In summary, the species and serotype specific binding properties of the produced mAbs and their reactivity with *C. sakazakii* cells allow the reliable serological differentiation of *C. sakazakii* serotypes O1-O3.

Because of the time-consuming and laborious nature of the cultivation procedures (ISO/TS 22964) or cultivation methods followed by real-time PCR (U.S.-FDA) that are presently approved as reference methods for the screening of *C. sakazakii* in food, there is an increased need for a complementary, easy, reliable and rapid detection method to prevent life-threatening infections in neonates and premature infants. The application of antibodies for the identification of foodborne pathogens is an accepted approach and enzyme immunoassays satisfy the requirements for rapid methods. The advantages of immuno-based methods have led to the production of different commercially available immunological assays for the rapid detection of pathogens, spores or toxins (53). For the detection of *Cronobacter* spp. several protocols using mAbs and pAbs have been published. Park *et al.* established a pAb-based sandwich EIA for the detection of *C. muytjensii* using chicken anti-*C. muytjensii* IgY and rabbit anti-*C. muytjensii* IgG, achieving detection limits of 2.0×10^4 CFU/ml (32). Xu *et al.* (2014) described two different EIA formats: an indirect EIA using mAbs specific for the genus *Cronobacter* with a LOD of 10^5 CFU/ml and a more sensitive (LOD of 2×10^4 CFU/ml) sandwich EIA based on pAbs specific for *C. sakazakii* (31). Hochel & Škvor described the development of two pAb-based indirect competitive EIAs for the detection of the *C. sakazakii* strain CNCTC 5739 with detection limits ranging from 0.6×10^5 CFU/ml to 3.4×10^5 CFU/ml (30). However, none of these methods allows a distinction of different serotypes of *C. sakazakii*, probably due to the fact that protein (whole cell lysate) (32) or inactivated bacterial cells (30) were used as immunogen. With the approach of directly using LPS preparations as immunogen, these newly developed mAb-based sandwich EIAs enable, for the first time, the simultaneous detection and serotyping of *C. sakazakii* serotypes O1-O3. A detection limit of up to 2×10^3 CFU/ml for some strains using bacterial pure culture renders these optimized sandwich EIAs the most sensitive immunochemical detection system for *C. sakazakii* described so far.

The application of mAb-based sandwich EIAs to detect *C. sakazakii* serotypes O1-O3 in food products was investigated by spiking PIF. After enrichment for only 15 h, the LOD for the sandwich EIA was found to be as low as 1 CFU/10 g of PIF, thus considerably shortening the detection time compared to the classical methods. A large profit of the established sandwich EIAs is the possibility of detecting live as well as heat treated cells without having to forfeit reduction in the assay sensitivity (Fig. S3), simplifying the handling of samples at laboratories

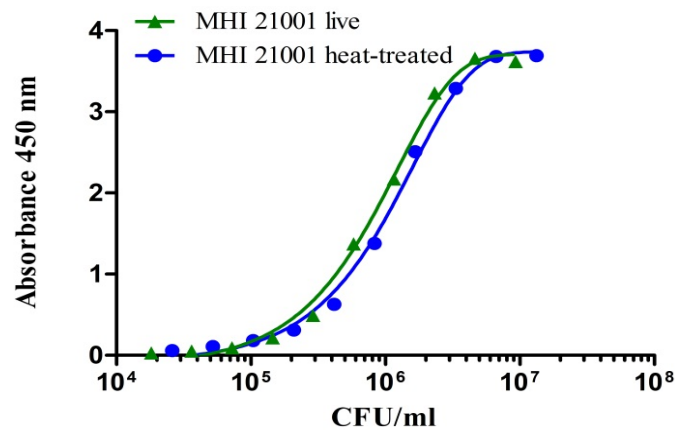


Figure S3. Evaluation of the established sandwich EIA for the detection of MHI 21001 (O1). Live and heat-treated (121°C, 15 min) bacterial cells were analyzed in tenfold serial dilutions using mAb 1C4 (10 µg/ml) as solid phase and 1C4-HRP (1:1000 in 1% caseinate/PBS) as detection antibody.

without special safety classification. Further on, samples could be directly analyzed without the need of isolating or concentrating bacterial cells from the enriched broth. These facts highlight the robustness as well as the simple practical application of the sandwich EIA.

In conclusion, it was possible to create three monoclonal IgG antibodies that specifically recognize and differentiate *C. sakazakii* serotypes O1-O3. The ability to bind to live *C. sakazakii* cells makes these mAbs suitable to detect this pathogen in food, environment and clinical samples using a developed sandwich EIA capture system. In contrast to the laborious and time-consuming traditional culture detection methods, the high specificity and sensitivity combined with the simple and rapid work flow of this method permits accurate and reliable detection of *C. sakazakii* serotypes O1-O3 in pure culture and powdered infant formula within 15 hours. This study represents the first approach to simultaneously detect and serotype bacteria based on mAbs. Future work will involve the production of mAbs for the *C. sakazakii* serotypes O4 and O7. With a complete panel of mAbs, all relevant *C. sakazakii* serotypes could be detected in parallel. Further on, the currently used antigenic typing system for serotyping *C. sakazakii* would considerably be improved.

REFERENCES

1. **Lai KK.** 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **80**:113-122.
2. **Corti G, Panunzi I, Losco M, Buzzi R.** 2007. Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man. *J Chemother* **19**:94-96.
3. **Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, Callanan JJ, Fanning S.** 2010. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis* **7**:339-350.
4. **Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, Boothe E, Lathrop S, Palmer A, Bowen A.** 2014. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis* **20**:1520-1523.
5. **Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H.** 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evol Biol* **7**:64.
6. **Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, Stephan R, Joosten H.** 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1442-1447.

7. **Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R.** 2009. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol* **136**:165-168.
8. **Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, Levican A, Figueras MJ, Forsythe SJ.** 2012. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**:1277-1283.
9. **Jason J.** 2012. Prevention of invasive *Cronobacter* infections in young infants fed powdered infant formulas. *Pediatrics* **130**:1076-1084.
10. **Giovannini M, Verduci E, Ghisleni D, Salvatici E, Riva E, Agostoni C.** 2008. *Enterobacter sakazakii*: an emerging problem in paediatric nutrition. *J Int Med Res* **36**:394-399.
11. **Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, Cheetham P, Loc-Carrillo C, Fayet O, Prere MF, Forsythe SJ.** 2007. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J Clin Microbiol* **45**:3979-3985.
12. **Bowen AB, Braden CR.** 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis* **12**:1185-1189.
13. **Friedemann M.** 2009. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:1297-1304.
14. **Friedemann M.** 2007. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol* **116**:1-10.
15. **Baumgartner A, Grand M, Liniger M, Iversen C.** 2009. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *Int J Food Microbiol* **136**:189-192.
16. **van Acker J, de Smet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S.** 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol* **39**:293-297.

17. **Mullane N, O'Gaora P, Nally JE, Iversen C, Whyte P, Wall PG, Fanning S.** 2008. Molecular analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-antigen gene locus. *Appl Environ Microbiol* **74**:3783-3794.
18. **Jarvis KG, Grim CJ, Franco AA, Gopinath G, Sathyamoorthy V, Hu L, Sadowski JA, Lee CS, Tall BD.** 2011. Molecular characterization of *Cronobacter* lipopolysaccharide O-antigen gene clusters and development of serotype-specific PCR assays. *Appl Environ Microbiol* **77**:4017-4026.
19. **Sun Y, Wang M, Liu H, Wang J, He X, Zeng J, Guo X, Li K, Cao B, Wang L.** 2011. Development of an O-antigen serotyping scheme for *Cronobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol* **77**:2209-2214.
20. **Sun Y, Wang M, Wang Q, Cao B, He X, Li K, Feng L, Wang L.** 2012. Genetic analysis of the *Cronobacter sakazakii* O4 to O7 O-antigen gene clusters and development of a PCR assay for identification of all *C. sakazakii* O serotypes. *Appl Environ Microbiol* **78**:3966-3974.
21. **Müller A, Stephan R, Fricker-Feer C, Lehner A.** 2013. Genetic diversity of *Cronobacter sakazakii* isolates collected from a Swiss infant formula production facility. *J Food Prot* **76**:883-887.
22. **Blažková M, Javurková B, Vlach J, Göselová S, Karamonová L, Ogrodzki P, Forsythe S, Fukal L.** 2015. Diversity of O antigens within the genus *Cronobacter*: from disorder to order. *Appl Environ Microbiol* **81**:5574-5582.
23. **Xu X, Li C, Wu Q, Zhang J, Huang J, Yang G.** 2015. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *Int J Food Microbiol* **204**:17-23.
24. **Yan Q, Wang J, Gangiredla J, Cao Y, Martins M, Gopinath GR, Stephan R, Lampel K, Tall BD, Fanning S.** 2015. Comparative genotypic and phenotypic analysis of *Cronobacter* species cultured from four powdered infant formula production facilities: Indication of pathoadaptation along the food chain. *Appl Environ Microbiol* **81**:4388-4402.
25. **Chen Y, Noe KE, Thompson S, Elems CA, Brown EW, Lampel KA, Hammack TS.** 2012. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection of *Cronobacter* in powdered infant formula: a collaborative study. *J Food Prot* **75**:1144-1147.

26. **Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H.** 2007. Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). J Clin Microbiol **45**:3814-3816.
27. **Yan Q, Fanning S.** 2015. Strategies for the identification and tracking of *Cronobacter* species: an opportunistic pathogen of concern to neonatal health. Front Pediatr **3**:38.
28. **Yan Q, Jarvis KG, Chase HR, Hebert K, Trach LH, Lee C, Sadowski J, Lee B, Hwang S, Sathyamoorthy V, Mullane N, Pava-Ripoll M, Iversen C, Pagotto F, Fanning S, Tall BD.** 2015. A proposed harmonized LPS molecular-subtyping scheme for *Cronobacter* species. Food Microbiol **50**:38-43.
29. **Ogrodzki P, Forsythe S.** 2015. Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis. BMC Genomics **16**:758.
30. **Hochel I, Škvor J.** 2009. Characterisation of antibodies for the immunochemical detection of *Enterobacter sakazakii*. Czech J Food Sci **27**:66-74.
31. **Xu X, Zhang Y, Shi M, Sheng W, Du XJ, Yuan M, Wang S.** 2014. Two novel analytical methods based on polyclonal and monoclonal antibodies for the rapid detection of *Cronobacter* spp.: Development and application in powdered infant formula. Lwt-Food Sci Technol **56**:335-340.
32. **Park S, Shukla S, Kim Y, Oh S, Hun Kim S, Kim M.** 2012. Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*). Microbiol Immunol **56**:472-479.
33. **Lugtenberg B, Vanalphen L.** 1983. Molecular architecture and functioning of the outer-membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta **737**:51-115.
34. **Reeves PP, Wang L.** 2002. Genomic organization of LPS-specific loci. Pathogenicity Islands and the Evolution of Pathogenic Microbes, Vol 1 **264**:109-135.
35. **Sambrook JR, D. W.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

36. **Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, Diep B, Thelen K, Stephan R.** 2006. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol* **6**:15.
37. **Carter L, Lindsey LA, Grim CJ, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, Gopinath G, Lee C, Sadowski JA, Trach L, Pava-Ripoll M, McCardell BA, Tall BD, Hu L.** 2013. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*. *Appl Environ Microbiol* **79**:734-737.
38. **Schauer K, Lehner A, Dietrich R, Kleinstaub I, Canals R, Zurfluh K, Weiner K, Martlbauer E.** 2015. A *Cronobacter turicensis* O1 antigen-specific monoclonal antibody inhibits bacterial motility and entry into epithelial cells. *Infect Immun* **83**:876-887.
39. **Dietrich R, Usleber E, Märklbauer E.** 1998. The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins. *Analyst* **123**:2749-2754.
40. **Bremus A, Dietrich R, Dettmar L, Usleber E, Martlbauer E.** 2012. A broadly applicable approach to prepare monoclonal anti-cephalosporin antibodies for immunochemical residue determination in milk. *Anal Bioanal Chem* **403**:503-515.
41. **Wang L, Hu X, Tao G, Wang X.** 2012. Outer membrane defect and stronger biofilm formation caused by inactivation of a gene encoding for heptosyltransferase I in *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894. *J Appl Microbiol* **112**:985-997.
42. **Kido N, Ohta M, Iida K, Hasegawa T, Ito H, Arakawa Y, Komatsu T, Kato N.** 1989. Partial deletion of the cloned *rfb* gene of *Escherichia coli* O9 results in synthesis of a new O-antigenic lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **171**:3629-3633.
43. **Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Forsythe SJ.** 2009. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *Int J Food Microbiol* **136**:227-231.
44. **Mozrová V, Břeňová N, Mrázek J, Lukešová D, Marounek M.** 2014. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples. *Folia Microbiologica* **59**:63-68.

45. **Pan Z, Cui JH, Lyu GP, Du XL, Qin LY, Guo YM, Xu BH, Li W, Cui ZG, Zhao C.** 2014. Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula. Foodborne Pathog Dis **11**:456-461.
46. **Xu X, Wu Q, Zhang J, Ye Y, Yang X, Dong X.** 2014. Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in powdered formula from Chinese retail markets. Foodborne Pathog Dis **11**:307-312.
47. **Willis LM, Whitfield C.** 2013. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. Carbohydr Res **378**:35-44.
48. **Jung JH, Choi NY, Lee SY.** 2013. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. Food Microbiol **34**:70-80.
49. **Westerman RB, He Y, Keen JE, Littledike ET, Kwang J.** 1997. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157. J Clin Microbiol **35**:679-684.
50. **Ng SP, Tsui CO, Roberts D, Chau PY, Ng MH.** 1996. Detection and serogroup differentiation of *Salmonella* spp. in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. Appl Environ Microbiol **62**:2294-2302.
51. **Arbatsky NP, Sun Y, Shashkov AS, Wang M, Liu B, Daeva ED, Wang L, Knirel YA.** 2012. Structure and genetics of the O-antigen of *Cronobacter sakazakii* G2726 (serotype O3) closely related to the O-antigen of *C. muytjensii* 3270. Carbohydr Res **355**:50-55.
52. **MacLean LL, Vinogradov E, Pagotto F, Farber JM, Perry MB.** 2009. Characterization of the O-antigen in the lipopolysaccharide of *Cronobacter (Enterobacter) malonaticus* 3267. Biochem Cell Biol **87**:927-932.
53. **Law JWF, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH.** 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Front Microbiol **5**.

54. **Mullane NR, Ryan M, Iversen C, Murphy M, O'Gaora P, Quinn T, Whyte P, Wall PG, Fanning S.** 2008. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for the molecular subtyping of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol* **74**:1223-1231.
55. **Himelright I, E. Harris, V. Lorch, M. Anderson, T. Jones, A. Craig, M. Kuehnert, T., Forster MA, B. Jensen, and D. Jernigan.** 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula--Tennessee, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **51**:297-300.
56. **Hartmann I, Carranza P, Lehner A, Stephan R, Eberl L, Riedel K.** 2010. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **76**:2251-2261.
57. **Stephan R, Lehner A, Tischler P, Rattei T.** 2011. Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates. *J Bacteriol* **193**:309-310.
58. **Schubert RHW.** 1968. The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936. *Int J Syst Evol Microbiol* **18**:1-7.
59. **Griffiths MS, Bosley JA.** 1993. Assessment of macroporous polystyrene-based polymers for the immobilization of *Citrobacter freundii*. *Enzyme Microb Technol* **15**:109-113.
60. **Stephan R, Grim CJ, Gopinath GR, Mammel MK, Sathyamoorthy V, Trach LH, Chase HR, Fanning S, Tall BD.** 2014. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**:3402-3410.
61. **Tracey RP, Britz TJ, Van Vuuren HJJ, Lategan PM.** 1986. Gas chromatographic determination of volatile metabolites formed by *Obesumbacterium proteus* and *Hafnia species*, vol 92. Institute of Brewing, London, Royaume-Uni.
62. **Lessel EF.** 1971. Status of the name *Proteus morganii* and designation of the neotype strain. *Int J Syst Evol Microbiol* **21**:55-57.

-
63. **Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA.** 1989. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**:225-420
 64. **Spröer C, Mendrock U, Swiderski J, Lang E, Stackebrandt E.** 1999. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **49**:1433-1438.

TABLE 1. Bacterial strains used in this study.

Strain number	Species	Origin	Reference	Sero-type
MHI 975 ^e	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	human	(1, 2)	O1
MHI 996	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O1
MHI 21000 ^{ef}	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O1
MHI 21001 ^{*ef}	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O1
MHI 21008 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O1
MHI 21011 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O1
MHI 21012 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O1
MHI 21028 ^e	<i>C. sakazakii</i> E655	human	^c	O1
MHI 21030	<i>C. sakazakii</i> E789	human	^c	O1
MHI 21038	<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA 893-1	milk powder	(3)	O1
MHI 21039 ^f	<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA 894	human	(4)	O1
MHI 21040	<i>C. sakazakii</i> CDC 0996-77	human	(5)	O1
MHI 21086 ^e	<i>C. sakazakii</i>	milk powder	^a	O1
MHI 21172 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O1
MHI 977 ^{*e}	<i>C. sakazakii</i> NCTC 8155	tin of dried milk	(1)	O2
MHI 978	<i>C. sakazakii</i> NCTC 9238	human	(1)	O2
MHI 988 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O2
MHI 989	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O2
MHI 995 ^{ef}	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O2
MHI 998	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O2
MHI 999	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O2
MHI 21003 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O2
MHI 21004 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O2
MHI 21009	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O2
MHI 21010	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O2
MHI 21027	<i>C. sakazakii</i> E604	human	^c	O2
MHI 21029 ^{ef}	<i>C. sakazakii</i> E785	human	^c	O2
MHI 21032	<i>C. sakazakii</i> E796	human	^c	O2

Table 1. continued

MHI 21035 ^f	<i>C. sakazakii</i> E886	human	^c	O2
MHI 21037	<i>C. sakazakii</i> E786	human	^c	O2
MHI 21041	<i>C. sakazakii</i> CDC 1123-79	human	(5)	O2
MHI 21042	<i>C. sakazakii</i> ES5	human	(6)	O2
MHI 21098	<i>C. sakazakii</i> E767	milk powder	^c	O2
MHI 21122 ^e	<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	unknown	(7)	O2
MHI 21125	<i>C. sakazakii</i> 0306 E-L-1031	milk	^d	O2
MHI 21126	<i>C. sakazakii</i>	animal food	^a	O2
MHI 982	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O3
MHI 990 ^{*ef}	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O3
MHI 21006 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O3
MHI 21007 ^f	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O3
MHI 21013	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O3
MHI 21014 ^e	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O3
MHI 21036	<i>C. sakazakii</i> E535	human	^c	O3
MHI 21129	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O3
MHI 21130	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O3
MHI 21131	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O3
MHI 21132	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O3
MHI 21166 ^f	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O3
MHI 21167	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O3
MHI 21168	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O3
MHI 21169	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O3
MHI 21051	<i>C. sakazakii</i>	milk powder	^a	O4
MHI 21052	<i>C. sakazakii</i>	milk powder	^a	O4
MHI 21053	<i>C. sakazakii</i>	milk powder	^a	O4
MHI 21067	<i>C. sakazakii</i>	milk powder	^a	O4
MHI 21106	<i>C. sakazakii</i> SU12_107; H1619/1	food	(8)	O4
MHI 21107	<i>C. sakazakii</i> SU12_106; H1602	food	(8)	O4
MHI 21170	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O4
MHI 993	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^a	O7

Table 1. continued

MHI 21066	<i>C. sakazakii</i>	milk powder	^a	O7
MHI 21109	<i>C. sakazakii</i> SU12_70; H2496	food	(8)	O7
MHI 21110	<i>C. sakazakii</i> SU12_120; H1651	environment IFM factory	(8)	O7
MHI 21111	<i>C. sakazakii</i> SU12_27; A31	environment IFM factory	(8)	O7
MHI 21133	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O7
MHI 21134	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O7
MHI 21135	<i>C. sakazakii</i>	food	^b	O7
MHI 21136	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O7
MHI 21171	<i>C. sakazakii</i>	baby food	^b	O7
MHI 21173	<i>C. sakazakii</i>	milk powder	^a	O7
MHI 21097	<i>C. condimenti</i> LMG 26250 ^T	food	(9)	
MHI 979	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> NCTC 9844	unknown	(7)	
MHI 980	<i>C. dublinensis</i> NCTC 9846 ^T	unknown	(7)	
MHI 21093	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i> LMG 23823 ^T	milk powder	(7)	
MHI 21094	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> LMG 23824 ^T	water	(7)	O2
MHI 21095	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i> LMG 23825 ^T	milk powder	(7)	O1
MHI 986	<i>C. malonaticus</i>	baby food	^a	O2
MHI 987	<i>C. malonaticus</i>	baby food	^a	O2
MHI 992	<i>C. malonaticus</i>	baby food	^a	O2
MHI 994	<i>C. malonaticus</i>	baby food	^a	O2
MHI 21002	<i>C. malonaticus</i>	baby food	^b	O2
MHI 21005	<i>C. malonaticus</i>	baby food	^b	O2
MHI 21091	<i>C. malonaticus</i> DSM 18702	human	(7)	O2
MHI 21031	<i>C. muytjensii</i> E793	human	^c	O2
MHI 21096	<i>C. muytjensii</i> DSM 21870	unknown	(7)	O2
MHI 21209	<i>C. muytjensii</i> E456	unknown	^c	O2

Table 1. continued

MHI 21212	<i>C. muytjensii</i> E769	milk powder	^c	O1
MHI 21213	<i>C. muytjensii</i> E888	milk powder	^c	O1
MHI 21026	<i>C. turicensis</i> 3032 LMG 23827 ^T	neonate	(7, 10)	O1
MHI 21049	<i>C. turicensis</i> E625	baby food	^c	O3
MHI 21050	<i>C. turicensis</i> E609	food	^c	O3
MHI 981	<i>C. universalis</i> NCTC 9529 ^T	fresh water	(9)	O1
MHI 21128	<i>Acinetobacter</i> spp.	food	^a	
MHI 1004	<i>Aeromonas media</i> DSM 30020	pasteurized milk	(11)	
MHI 903	<i>Citrobacter</i> spp. DSM 3004	food	(12)	
MHI 701	<i>E. coli</i> DSM 682	unknown		
MHI 969	<i>Enterobacter aerogenes</i>	unknown	^a	
MHI 968	<i>Enterobacter asburiae</i>	unknown	^a	
MHI 904	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30054	spinal fluid		
MHI 21103	<i>Franconibacter helveticus</i> LMG 23732 ^T	fruit powder	(13)	
MHI 21105	<i>Franconibacter pulveris</i> LMG 24057 ^T	fruit powder	(13)	
MHI 910	<i>Hafnia alvei</i> DSM 30097	unknown	(14)	
MHI 21024	<i>Klebsiella pneumonia</i>	calf	^a	
MHI 905	<i>Moellerella wisconsensis</i>	food	^a	
MHI 991	<i>Morganella morganii</i> DSM 6675	faeces	(15)	
MHI 946	<i>Proteus vulgaris</i> DSM 2140	inner ear infection		
MHI 952	<i>Providencia stuartii</i> DSM 6676	faeces		
MHI 1000	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 939	water		
MHI 21046	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> DSM 17420	unknown	(16)	

Table 1. continued

MHI 974	<i>Serratia rubidaea</i> DSM 4480	type strain	(17)
MHI 21104	<i>Siccibacter turicensis</i> LMG 23730 ^T	fruit powder	(13)
MHI 914	<i>Shigella flexneri</i> DSM 4782	type strain	

* Strains used for immunization. They were randomly chosen from a group of well characterized food-isolates.

^a Chair of Hygiene and Technology of Milk, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany

^b Institute of Veterinary Food Science, Justus-Liebig-Universität Giessen, Germany

^c Institute for Food Safety and Hygiene, University of Zürich, Switzerland

^d Chair of Animal Hygiene, Technische Universität München, Freising, Germany

^e Strains used for analysis in immunoblotting

^f Strains used for analysis in motility assays

IV. DISKUSSION

Infektionen mit den ubiquitären und opportunistischen Krankheitserregern *Cronobacter* spp., im Speziellen mit den Spezies *C. sakazakii*, *C. turicensis* und *C. malonaticus*, führen zu schwerwiegenden Erkrankungen in Patienten aller Altersstufen. In vorerkrankten und immunsupprimierten älteren Menschen wurden bspw. *Cronobacter*-bedingte Pneumonien, Osteomyelitiden, Sepsen oder Harnwegsinfektionen beschrieben. Bei Neonaten treten Krankheitsfälle weitaus seltener auf, sind jedoch Gegenstand zahlreicher Publikationen, da diese Infektionen im Vergleich zu Erwachsenen in bis zu 80 % der Fälle letal verlaufen. Die noch unausgeprägte Darm-Blut-Schranke und das noch nicht vollständig ausgereifte Immunsystem machen Säuglinge besonders anfällig für eine Infektion und die damit einhergehenden Erscheinungsformen wie nekrotisierende Enterocolitis (NEC), Sepsis und Meningitis (Bowen & Braden, 2006, Friedemann, 2009).

Für die Infektion von Neonaten konnte ein epidemiologischer Zusammenhang mit der oralen oder enteralen Aufnahme von pulverförmiger Säuglingsnahrung (*powdered infant formula*, PIF) hergestellt werden. Zum Schutz der Gesundheit von Kleinkindern ist deshalb die Überprüfung von Säuglingsnahrung und von „getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere Zwecke“ für Kleinkinder jünger als 6 Monate laut Verordnung VO (EU) Nr. 365/2010 der Kommission vom 28. April 2010 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/200 (Anhang I, lfd. Nr. 1.24) vorgeschrieben. Demnach dürfen *Cronobacter* spp. in 10 g untersuchter Probe (ISO/TS 22964 I IDF/RM 210:2006) nicht nachgewiesen werden. Die Referenzmethode für den Nachweis von *Cronobacter* spp. besteht aus mehreren nicht-selektiven und selektiven Kultivierungsschritten sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedien. Dabei beruht die Auswahl verdächtiger Kolonien auf ihrer charakteristischen blau-grünen Färbung auf chromogenen Nährböden bzw. auf einer gelben Pigmentierung auf TSA. Diese Kriterien sind allerdings unsicher, da auch andere α -Glucosidase-positive *Enterobacteriaceae* das Substrat chromogener Nährböden umsetzen können und wiederum nicht alle *Cronobacter*-Stämme als verdächtige gelbe Kolonien auf TSA erscheinen (Iversen *et al.*, 2007b, Lehner *et al.*, 2006). Ein weiterer Nachteil dieser

arbeitsintensiven Methode besteht darin, dass bis zur Bestätigung eines positiven Ergebnisses mitunter 6 Tage verstreichen können. Auch etablierte PCR-Verfahren sind – trotz erheblicher Zeiteinsparung – aufgrund der teilweise unspezifischen Reaktivität einzelner Primer, nur unzureichend verlässlich. Hinzu kommt, dass diese Methodik auf eine kostenintensive Laborausstattung (PCR-Cycler und real-time PCR-Reagenzien) angewiesen ist und deshalb nicht als betriebsinternes Schnelldiagnostiksystem während der Produktion, oder für die Untersuchung in kleinen Laboren geeignet ist.

Die Möglichkeit, *C. sakazakii* mit einem schnellen, robusten und zuverlässigen Schnelldiagnostiksystem zu detektieren, könnte in PIF-herstellenden Betrieben maßgeblich zur Überprüfung von lebensmittelrechtlichen Vorschriften und so zur Verhinderung von lebensgefährlichen Infektionen bei Säuglingen beitragen. Aufgrund des Mangels an zuverlässigen und einfachen Schnelldiagnostiksystemen war das Ziel dieser Arbeit, auf mAbs basierende Sandwich EIA Systeme zu etablieren, die für den spezifischen Nachweis von *C. sakazakii* geeignet sind.

1. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Für die Etablierung von Sandwich EIAs stand bereits aus früheren Arbeiten ein Serotyp O1-spezifischer mA (1C4) zur Verfügung, der aus einer Immunisierung mit Polymyxin-B behandeltem Keimmateriel stammte (Kleinstüber, 2015). Das verwendete Protein- und LPS-reiche Lysat erwies sich als hoch immunogen und induzierte hohe Antikörper-Titer in den immunisierten Mäusen. Da der mA 1C4 in indirekten EIAs nur mit einzelnen *C. sakazakii*-Stämmen aus der *Cronobacter*-Stammsammlung reagierte und Immunoblot-Analysen von *Cronobacter*-LPS-Präparationen ein leiterartiges Bandenmuster zeigten, wurde von Kleinstüber (2015) vermutet, dass die O-spezifische Seitenkette des LPS die antigene Determinante für diesen mA darstellt.

Da die Serotypenteilung bei Bakterien auf der Grundlage der unterschiedlichen Zusammensetzung der O-spezifischen Seitenkette des LPS beruht, bestanden die ersten Schritte der vorliegenden Arbeit in der genetischen Charakterisierung der aus mehr als 100 Stämmen bestehenden *Cronobacter*-Stammsammlung. Alle *Cronobacter*-Stämme wurden hierfür mittels konventioneller und multiplex PCR

auf Genus, Spezies und Serotyp untersucht (Mullane *et al.*, 2008, Stoop *et al.*, 2009, Jarvis *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2015). Die Ergebnisse bestätigten die von Kleinsteuber (2015) aufgestellte Hypothese, dass die Reaktivität des mAks 1C4 spezies- und serotypspezifisch ist. Bereits Jaradat *et al.* (2011) versuchten durch Immunisierungen mit reinem LPS von *C. muytjensii* spezifische mAks zu produzieren. Allerdings konnten mit diesem Verfahren keine stabilen Hybridomzelllinien etabliert werden. Kleinsteuber (2015) führt den Erfolg der Polymyxin B-Methode zur Immunogenherstellung auf eine gesteigerte Immunantwort, bspw. durch eine mögliche Erhöhung der Strukturkomplexität von LPS durch die Bindung des amphiphilen Antibiotikums an die LPS-Phosphatreste und das Lipid A, oder auf die adjuvante Wirkung von Polymyxin B (Yoshino *et al.*, 2013) zurück.

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit darin lag, mit einem Schnellnachweis möglichst alle *C. sakazakii*-Stämme nachweisen zu können, konzentrierten sich die wesentlichen Schritte auf die Etablierung weiterer mAks, um neben dem *C. sakazakii* Serotyp O1 auch die restlichen Serotypen nachweisen zu können. Laut Literatur können sowohl in klinischen als auch in lebensmittelassoziierten Isolaten die *C. sakazakii* Serotypen O1 und O2 mehrheitlich nachgewiesen werden (Yan *et al.*, 2015, Blažková *et al.*, 2015). Für die verbleibenden Serotypen O3, O4 und O7 sind unterschiedliche Häufigkeiten beschrieben worden. Blažková *et al.* (2015) gehen davon aus, dass neben den Serotypen O1 und O2 nur noch Serotyp O4 in klinischen Isolaten auftritt, während die Serotypen O3 und O7 nur in PIF Proben nachgewiesen werden können. Yan *et al.* (2015) zeigten hingegen, dass bei klinischen *C. sakazakii*-Isolaten (n=23) neben den Serotypen O1 und O2 auch der Serotyp O3 auftrat. Auch in der lehrstuhleigenen *Cronobacter*-Stammsammlung konnten – wie bei Yan *et al.* (2015) – keine klinischen Isolate dem Serotyp O4 zugeordnet werden. Der Serotyp O7 hingegen konnte von Yan *et al.* (2015) weder in PIF noch in klinischen Fällen nachgewiesen werden. Weitestgehend stimmt die von Yan *et al.* (2015) beschriebene Serotypverteilung der klinischen Isolate mit den Untersuchungsergebnissen der *Cronobacter*-Stammsammlung des Lehrstuhls überein (Tabelle 3). Unter den klinischen und lebensmittelassoziierten *Cronobacter*-Isolaten der eigenen Stammsammlung konnte neben den Serotypen O1 und O2 auch der Serotyp O3 häufig nachgewiesen werden. In 20 % der PIF-Proben konnte außerdem auch der Serotyp O7 identifiziert werden.

Tabelle 3: Vergleich der *C. sakazakii*-Serotypverteilung der Stammsammlungen des University College Dublin (Yan *et al.*, 2015) mit der des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, LMU (diese Studie)

	Yan <i>et al.</i> (2015)		Eigene Untersuchungen (2016)	
	Isolate aus PIF/PIF-Umgebung (n=126) in %	Klinische Isolate (n= 23) in %	Isolate aus PIF/PIF-Umgebung (n=54) in %	Klinische Isolate (n= 15) in %
O1	56,3	26	16,7	33,3
O2	19,0	61	24	60
O3	15,1	13	26	6,7
O4	9,5	0	12,9	0
O7	0	0	20,3	0

Zusätzlich konnten Alsonosi *et al.* (2015) zeigen, dass neben der Spezies *C. sakazakii* auch *C. malonaticus* ein erhebliches Gesundheitsrisiko für Patienten aller Altersstufen darstellt. In einer Sammlung von 51 in Krankenhäusern isolierten *Cronobacter*-Stämmen konnten neben einem großen Anteil von *C. sakazakii* (65 %) hauptsächlich *C. malonaticus* (33 %) identifiziert werden. Deshalb sollten in dieser Studie schwerpunktmäßig spezifische Antikörper zum Nachweis der *C. sakazakii* Serotypen O2 und O3 etabliert werden. Um mittels Polymyxin B-Vorbehandlung Immunisierungsmaterial herzustellen wurden die *C. sakazakii*-Stämme MHI 21029 (Serotyp O2), MHI 990 (Serotyp O3) ausgewählt (III. Publikation, S. 18 ff.). In einem weiteren Versuch wurden auch die Stämme *C. sakazakii* MHI 21109 (Serotyp O7) und *C. malonaticus* MHI 987 (Serotyp O2) verwendet, um mAks gegen diese Stämme zu generieren und die diagnostische Lücke für *C. sakazakii* Serotyp O7 und *C. malonaticus* Serotyp O2 schließen zu können (VIII. Anhang, S. 78 ff.). Die stark immunogene Wirkung der Lysate (Kleinsteuber, 2015) konnte in der Überprüfung der Antikörpertiter der Mäuse mittels indirekter EIAs bestätigt werden. Die spezifische Reaktivität der nach Zellfusion erhaltenen mAks mit *Cronobacter*-Stämmen der Stammsammlung wurde in indirekten EIAs überprüft. Dabei zeigten fünf mAks 2F8, 1A11, 1E2, 2B7 und 1E8, ähnlich wie der bereits vorhandene mAk 1C4 (O1) eine spezies- und serotypspezifische Reaktion (Tabelle 4) und wurden im weiteren Verlauf massenproduziert.

Tabelle 4: Charakteristika der im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von *Cronobacter* spp. etablierten mAks

	mAk	IgG-Subtyp	Spezifität für		Target	Inklusivität ^a
			<u>Spezies</u>	<u>Serotyp</u>		
III. Publikation	1C4	IgG	<i>C. sakazakii</i>	O1	EPS	13/14
	2F8	IgG	<i>C. sakazakii</i>	O2	LPS	20/20
	1A11	IgG	<i>C. sakazakii</i>	O3	LPS	13/15
VIII. Anhang	1E2	IgM	<i>C. sakazakii</i>	O7	Polysaccharid	9/11
	2B7	IgG	<i>C. sakazakii</i>	O7	Flagelle	8/11
	1E8	IgG	<i>C. malonaticus</i>	O2	LPS	4/7

^a: Anzahl der positiv getesteten Stämme unter allen überprüften *Cronobacter*-Stämmen eines Serotyps

Für die spezifischen mAks 2F8 (O2) und 1A11 (O3) konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunoblot-Analysen Polysaccharid auf der Bakterienoberfläche als antigene Determinante bestätigt werden. Zur weiteren Charakterisierung wurden die mAks im Motilitätsassay eingesetzt. Schauer *et al.* (2015) beschrieben eine Reduktion des Membranpotentials durch die Bindung des *C. turicensis* Serotyp O1-spezifischen mAks 2G4 an Lipopolysaccharid, in Folge dessen die Flagellenbewegung und damit die Motilität der Bakterien, gemessen an dem Durchmesser der Motilitätszonen, gehemmt wurde. Diese Wirkung konnte auch im Motilitätsassay mit den mAks 2F8 (O2) und 1A11 (O3) bestätigt werden. Der mAk 1C4 gegen *C. sakazakii* Serotyp O1 zeigte – wie die beiden anderen mAks – auch ein für Polysaccharid spezifisches Bandenmuster im Immunoblot, resultierte allerdings in einer punktuell verteilten Fluoreszenz auf der Bakterienoberfläche. Außerdem konnte der mAk 1C4 (O1) die Motilität von *C. sakazakii* Serotyp-O1 Stämmen nicht hemmen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass LPS die antigene Determinanten der mAks 2F8 (O2) und 1A11 (O3) darstellt, während der mAk 1C4 (O1) mit Exopolysaccharid (EPS) reagiert.

Ähnlich wie die mAks 1C4 (O1) und 1A11 (O3), die mit vereinzelt *C. sakazakii*-Stämmen des jeweiligen Serotyps nicht reagierten, zeigten auch die mAks gegen *C. sakazakii* Serotyp O7 (mAk 1E2 und 2B7) und der mAk gegen *C. malonaticus* Serotyp O2 (mAk 1E8) im indirekten EIA vereinzelt mit einigen Stämmen keine Reaktion (Tabelle 4 und VIII. Anhang, Tabelle A1). Daraufhin wurde zunächst vermutet, dass möglicherweise die Ausbildung einer bei manchen *Cronobacter*-Stämmen beschriebenen Kapsel die Bindung der mAks verhindern würde. Allerdings blieben alle Versuche, eine Kapsel mittels Negativfärbung (Nigrosin) mikroskopisch darzustellen, ohne eindeutiges Ergebnis. Für den *C. sakazakii*-Stamm MHI 21040 (Serotyp O1) wurden in einer bisher unveröffentlichten Studie (K. Schauer, persönliche Mitteilung) Hinweise auf eine veränderte Zusammensetzung der Bakterienoberfläche erhalten, da nur dieser Stamm unfähig war, MAP-Kinasen (ERK, p38 und JNK) in humanen Kolonepithelzellen (Caco-2) zu aktivieren. Möglicherweise stellen ähnliche Modifikationen die Ursache für die fehlende Reaktivität mancher *C. sakazakii* Serotyp O7- bzw. *C. malonaticus* Serotyp O2-Stämme mit den mAks dar.

Für die beiden mAks 1E2 und 2B7, welche beide spezifisch mit den *C. sakazakii*-Stämmen des Serotyps O7 reagieren, konnten mittels Immunfluoreszenz und insbesondere Immunoblot-Analysen unterschiedliche antigene Determinanten – Polysaccharid bzw. Flagellenstrukturen – identifiziert werden (Tabelle 4, VIII. Anhang, S. 80 ff.). Zur weiteren Charakterisierung des mAks 2B7 (*C. sakazakii* O7) wurde ebenfalls ein Motilitätsassay eingesetzt und es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Bindung von LPS-spezifischen mAks 2F8 (O2) und 1A11(O3), sondern auch die Bindung des Flagellen-spezifischen mAks 2B7 die Motilität der Bakterien deutlich reduziert (III. Publikation, VIII. Anhang Abbildung A3). Der Anti-Flagellen-mAk ist nicht nur als Detektionsantikörper einsetzbar, er könnte bspw. in Infektionsversuchen auch wichtige Erkenntnisse in der Untersuchung der Virulenz- und Pathogenitätsmechanismen von *C. sakazakii* liefern. In zu dieser Arbeit parallel laufenden Studien, konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibierung der Flagellenrotation durch Bindung des mAks 2B7 (O7) zu einer verminderten Invasion in Wirtszellen bei *C. sakazakii* Serotyp O7 führt (K. Schauer, persönliche Mitteilung).

In der Literatur ist bisher lediglich die Etablierung und Charakterisierung von pAks bzw. mAks für den immunchemischen Nachweis von *C. sakazakii*, *C. muytjensii* und *C. turicensis* beschrieben worden (Hochel & Škvor, 2009, Park *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2014, Kleinsteuber, 2015, Schauer *et al.*, 2015). Der in dieser Arbeit etablierte mAk 1E8 ist somit der erste spezifische mAk der den Nachweis von *C. malonaticus* Serotyp O2 ermöglichen würde (Tabelle 4). Die Analysen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, Immunoblot und Motilitätsassay (VIII. Anhang, S. 82 ff.) deuten darauf hin, dass LPS mit hoher Sicherheit die antigene Determinante dieses mAks darstellt. Aufgrund der Reaktivität des mAks 1E8 mit nur 4 von den 7 getesteten *C. malonaticus*-Stämmen des Serotyps O2 ist allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass innerhalb des *C. malonaticus* O2-Serotyps unterschiedliche Varianten des Polysaccharids vorliegen. Arbatsky *et al.* (2010) beschrieben bereits innerhalb der *C. sakazakii* Serotyp O2-Gruppe eine Variabilität, bestehend aus einer zusätzlichen Verzweigung und Acetylierung der O-Antigenstruktur. Eventuell könnte eine Variabilität des O-Antigens von *C. malonaticus* Serotyp O2 ebenfalls für die fehlende Reaktivität mancher Stämme mit dem mAk 1E8 in Betracht kommen.

Neben der Spezifität der mAks auf Serotypebene (Inklusivität), wurde auch die Spezifität der gewonnenen mAks auf der Genus- und Speziesebene (Exklusivität) mit einer breiten Auswahl von 42 weiteren Stämmen (*Cronobacter* Spezies, *Enterobacteriaceae* und Gram-negative Pathogene), u.a. Stämme der nah verwandten Spezies *Franconibacter helveticus*, *F. pulveris* und *Siccibacter turicensis*, die ebenfalls in PIF auftreten können (Stephan *et al.*, 2008), mittels indirekter EIAs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle mAks, mit Ausnahme von mAk 1A11 (O3) hoch spezifisch für die Gattung *Cronobacter*, die Spezies *sakazakii* und den jeweiligen Serotyp sind. Nur für den mAk 1A11 (O3) wurde eine Kreuzreaktivität mit *C. muytjensii* vom Serotyp O1 festgestellt. Dies war allerdings ein zu erwartender Effekt, da die LPS-Strukturen dieser beiden Serotypen aufgrund eines identischen O-Antigen-Biosynthesecusters gleiche Zuckerzusammensetzung und Verzweigung in den *repeating units* der O-spezifischen Seitenkette aufweisen (MacLean *et al.*, 2009b, Jarvis *et al.*, 2011, Arbatsky *et al.*, 2012).

2. Etablierung und Anwendung von Sandwich EIA-Systemen

Auf Antikörpern beruhende Nachweissysteme, wie EIAs sind aufgrund der vergleichsweise geringen Materialkosten, der einfachen Ausführung und der schnellen Durchführbarkeit als Schnellnachweise geeignet. Allerdings sind die bislang publizierten EIA-Nachweisverfahren für den grundsätzlichen Nachweis von *Cronobacter* spp. nicht tauglich, da beispielsweise nur ein Bruchteil von Stämmen nachgewiesen werden kann (Hochel & Škvor, 2009) oder das System zwar den spezifischen Nachweis von *C. muytjensii*, allerdings nicht von den weitaus häufigeren Spezies *C. sakazakii*, *C. turicensis* oder *C. malonaticus* zulässt (Park *et al.*, 2012). Xu *et al.* (2014) entwickelten zwei verschiedene EIA-Ansätze: Ein Sandwich EIA-Verfahren ermöglicht den spezifischen Nachweis von *C. sakazakii*, jedoch wurde das Verfahren lediglich mit vier Stämmen überprüft. Ein weiteres indirektes EIA-Verfahren, basierend auf pAks, erlaubt den spezifischen Nachweis von *Cronobacter* spp., ohne mit anderen Genera zu reagieren. Allerdings sind indirekte EIAs, im Gegensatz zu Sandwich EIAs, aufgrund ihrer allgemein niedrigeren Sensitivität und der fehlenden Praktikabilität (Beschichtung der Platten mit Antigen bzw. mit der Probe) für den Nachweis von Mikroorganismen in der Routinediagnostik ungeeignet.

Da sowohl Polysaccharide als auch Flagellenantigene stark immunogene und in hoher Anzahl auf der Bakterienoberfläche vorzufindende Strukturen sind, erschien es sinnvoll, den bereits vorhandenen (Kleinstauber, 2015) als auch die neuen mAks für die Etablierung serotypspezifischer, sensitiver und robuster Sandwich EIAs zu verwenden.

Dafür wurden die massenproduzierten und aufgereinigten mAks 1C4 (O1), 2F8 (O2), 1A11 (O3), 2B7 (O7) und 1E8 (*C. malonaticus*, O2) an aktivierte Peroxidase (HRP) gekoppelt und in Kombination mit den jeweils nicht-markierten mAks zunächst mittels Schachbrettitrationen überprüft, um die optimalen Arbeitskonzentrationen zu ermitteln. Mit dem Ziel in Sandwich EIA-Systemen möglichst hohe Extinktionswerte für positive Proben und gleichzeitig niedrige Werte für Negativkontrollen (Background) zu erreichen, wurden verschiedene

Puffer für die Verdünnung der Bakterien getestet. Für alle *C. sakazakii* bzw. *C. malonaticus*-Stämme der *Cronobacter*-Stammsammlung wurden die Nachweisgrenzen ermittelt, die unter optimalen Sandwich EIA-Bedingungen stammspezifisch zwischen 2×10^3 und 5×10^6 KbE/ml lagen. Damit ist die Sensitivität der neu entwickelten Sandwich EIAs im Vergleich zu publizierten EIA-Ansätzen, deren Nachweisgrenzen zwischen 2×10^4 und 3×10^5 KbE/ml liegen (Hochel & Škvor, 2009, Park *et al.*, 2012, Xu *et al.*, 2014), für einige Stämme deutlich höher.

Da die bis dato entwickelten EIAs für den direkten Einsatz zum Nachweis von *Cronobacter* spp. in Lebensmittelproben ungeeignet erschienen, war es ein besonderes Anliegen dieser Arbeit, die praktische Anwendbarkeit der etablierten Sandwich EIAs mit künstlich kontaminierten Milchpulverproben (PIF) zu bestätigen. Dafür wurden die etablierten Sandwich EIAs für die *C. sakazakii* Serotypen O1, O2 und O3 mit jeweils 3 Stämmen von jedem Serotyp überprüft. In jeweils 3 Ansätzen wurden die Milchpulverproben mit unterschiedlichen Bakterienzahlen zwischen 1-10 KbE pro 10 g PIF kontaminiert. Nach 15 h Anreicherung in GPW konnte *C. sakazakii*, mit Ausnahme von einer Probe, in allen Proben zuverlässig nachgewiesen werden. Die negativ-getestete Milchpulverprobe wurde rechnerisch gesehen mit nur 1 KbE kontaminiert, weswegen die Vermutung naheliegt, dass diese Probe, aufgrund der hohen Verdünnung der ursprünglichen Kultur höchstwahrscheinlich nicht wirklich kontaminiert wurde.

Die neun *C. sakazakii*-Stämme, die für die Kontaminationsversuche verwendet wurden, waren alle Isolate aus Milchpulver bzw. Babynahrung. Zum Vergleich wurden in orientierenden Versuchen auch klinische *Cronobacter*-Isolate für die Kontamination von PIF verwendet. Allerdings lagen die Extinktionswerte der Proben, welche mit 1-15 KbE künstlich kontaminiert wurden, z.T. deutlich unter den Werten für lebensmittelassoziierte Isolate. Erst für Ansätze, welche mit deutlich höheren Bakterienzahlen künstlich kontaminiert wurden, konnten vergleichbare Extinktionen wie mit lebensmittelassoziierten Isolaten erreicht werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Es konnte abschließend nicht ermittelt werden, ob die klinischen Stämme in Anwesenheit von Milchpulver in ihrem Wachstum gehemmt werden oder ein anderer Mechanismus ursächlich für die

geringen Extinktionswerte ist. Für den Nachweis von klinischen *Cronobacter*-Isolaten ist diese Beobachtung aber prinzipiell irrelevant, da man für diese Proben eine Anreicherung direkt in GPW ohne Milchpulverzusatz vornehmen würde. Da eine Anzucht dieser Stämme in LB-Bouillon ohne Probleme möglich war und keine Unterschiede in den Nachweisgrenzen zu anderen Stämmen festgestellt werden konnten, ist davon auszugehen, dass eine Anreicherung in purem GPW ebenfalls möglich ist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Kontaminationen von Proben mit 1 KbE *C. sakazakii* pro 10 g PIF mit den etablierten Nachweisverfahren bereits nach einer kurzen Voranreicherung serotypspezifisch nachgewiesen werden können. Die Tatsache, dass bei den etablierten Sandwich EIA-Verfahren auf keine zusätzlichen Konzentrierungs- oder Aufreinigungsschritte, z.B. über *magnetic beads* zurückgegriffen werden muss, verdeutlicht deren Robustheit und erlaubt es, die Durchführungsdauer auf ein Minimum zu reduzieren.

3. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit war es zum ersten Mal möglich, unter Verwendung von serotypspezifischen mAks robuste Sandwich EIA-Verfahren zu etablieren, die den zuverlässigen Nachweis von *C. sakazakii* und die Differenzierung der verschiedenen Serotypen ermöglicht. Damit eröffnen sich für die Routinediagnostik neue Möglichkeiten. So könnten bspw. in milchpulververarbeitenden Betrieben erste hausinterne Screenings während der Produktion durchgeführt werden, ohne dabei auf langwierige Kultivierungs- oder Anreicherungsschritte von bis zu einer Woche angewiesen zu sein.

Zusätzlich wäre auch die Verwendung der mAks für die Etablierung eines sog. Lateral Flow Streifens als gleichzeitiges Nachweis- und Serotypisierungstool denkbar. Dieses einfach durchzuführende Verfahren würde die schnelle Bestätigung und die Abklärung epidemiologischer Zusammenhänge von Infektionen bei größeren Ausbrüchen ermöglichen. In Hinblick auf ein vollständiges Set serotypspezifischer mAks wurde bereits von dem noch fehlenden *C. sakazakii* Serotyp O4 Immunisierungsmaterial vom Stamm MHI 21067 hergestellt und zur Immunisierung weiterer Mäuse verwendet. Nach

erfolgreicher Fusion würden somit mAks für den Nachweis von allen *C. sakazakii* Serotypen O1, O2, O3, O4, O7 zur Verfügung stehen. Durch den Einsatz dieser mAks könnte wahrscheinlich auch, im Vergleich zur Verwendung molekularbiologischer Verfahren, die Serotypisierung von *C. sakazakii*-Isolaten deutlich einfacher und zuverlässiger gestaltet werden. Um das Spektrum der detektierbaren Stämme auf der Speziesebene zu erweitern, könnten zudem zusätzlich die vorhandenen mAks gegen *C. malonaticus* Serotyp O2 (mAk 1E8) und gegen *C. turicensis* Serotyp O1 (mAk 2G4) (Schauer *et al.*, 2015) eingesetzt werden.

Um die Nachweisgrenze im Sandwich EIA um ein Vielfaches zu reduzieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit außerdem erste Versuche mittels *real-time quantitative immuno-PCR* (iPCR) durchgeführt (Sano *et al.*, 1992, Kwon *et al.*, 2014). Bei dieser Methode wird im ersten Schritt ein Sandwich EIA durchgeführt und dann, in einem zweiten Schritt, ein an den sekundären mAk gekoppeltes DNA-Fragment in einer *real time-PCR* amplifiziert. Laut Literatur soll mit diesem Verfahren eine Reduzierung der Nachweisgrenze um den Faktor 10-1000 möglich sein (Sano *et al.*, 1992, Niemeyer *et al.*, 2007). Allerdings konnte aufgrund von hohen unspezifischen Hintergrundsignalen die Nachweisgrenze des etablierten Sandwich EIAs für *C. sakazakii* Serotyp O2 in orientierenden Versuchen mittels iPCR bisher nicht wesentlich verbessert werden. Von Interesse wäre dieser Ansatz beispielsweise in Hinblick auf die benötigte Anreicherungszeit: Mit einer niedrigeren Nachweisgrenze könnte der Anreicherungsschritt noch weiter verkürzt werden. Aufgrund der benötigten Ausstattung (Light Cycler, PCR-Reagenzien) und der komplexen Methodik, ist dieses Verfahren allerdings weniger für betriebseigene Kontrollen, sondern vielmehr für spezialisierte Labore geeignet.

Der bereits in einer vorherigen (Kleinstüber, 2015) und dieser Arbeit verwendete methodische Ansatz zur Immunogen-Präparation mit Polymyxin B konnte auch erfolgreich auf andere *Enterobacteriaceae* übertragen werden. So ist es gelungen gegen pathogene *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* der Serovare O:8 und O:9 sowie der Subspezies *paleartica* vom Serovar O:3,4 ebenfalls LPS- bzw. Oberflächenprotein-spezifische mAks zu entwickeln (unveröffentlichte Ergebnisse). Somit könnte für den Nachweis pathogener *Yersinia enterocolitica*

mittelfristig ebenfalls ein Set serovarspezifischer mAks zur Verfügung stehen. Voraussetzung hierfür ist allerdings noch das Schließen diagnostischer Lücken, z.B. für die Serovar O:5,27.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Eine *Cronobacter sakazakii*-Infektion stellt vor allem für Säuglinge ein gesundheitliches Risiko dar. Die Untersuchung von *powdered infant formula* (PIF) mittels standardisierter kultureller Methoden ist mit einem erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden. Da sowohl etablierte PCR- als auch Enzymimmuntest (EIA)-Verfahren nicht den Anforderungen einer zuverlässigen und günstigen Schnelldiagnostik genügen, wurden in dieser Arbeit erstmals auf monoklonalen Antikörper (mAKs) basierende Sandwich EIAs für den spezifischen Nachweis von *C. sakazakii* der Serotypen O1, O2, O3 und O7 und *C. malonaticus* Serotyp O2 etabliert. Dafür wurden zuerst alle in der Stammsammlung befindlichen *Cronobacter* spp.-Stämme (n=91) mittels PCR auf Genus-, Spezies- und Serotypebene charakterisiert. Ausgewählte Stämme wurden mit Polymyxin B behandelt, um das so erhaltene Protein- und LPS-reiche Lysat für die Immunisierung von Mäusen einzusetzen. Die etablierten mAKs wurden mittels indirekter EIAs, Immunoblot, Immunfluoreszenz und Motilitätsassays eingehend charakterisiert. Dabei konnten Polysaccharid- bzw. Flagellenstrukturen als antigene Determinanten identifiziert werden. Außerdem wurde die serotypspezifische Reaktion der mAKs 1C4 (*C. sakazakii* O1), 2F8 (*C. sakazakii* O2), 2B7 (*C. sakazakii* O7) und 1E8 (*C. malonaticus* O2) bestätigt. Während diese mAKs keine Kreuzreaktivität mit anderen *Cronobacter* spp. oder mit Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* aufwiesen, reagiert der mAK 1A11 aufgrund einer identischen LPS-Struktur sowohl mit *C. sakazakii* Serotyp O3 als auch mit *C. muytjensii* vom Serotyp O1.

Mit allen mAKs konnten in dieser Arbeit Sandwich EIAs etabliert und stammspezifische Nachweisgrenzen im Bereich von 2×10^3 - 5×10^6 KBE/ml für Reinkulturen realisiert werden. Weiterhin konnte die Anwendbarkeit der Sandwich EIAs für den Nachweis von *C. sakazakii* der Serotypen O1-O3 in Säuglingsnahrung demonstriert werden: niedrige Keimzahlen von bis zu 1 KBE pro 10 g künstlich kontaminierter PIF waren nach einer Anreicherung von 15 h zuverlässig nachweisbar. Somit stehen zum ersten Mal sensitive, robuste und hoch spezifische immunochemische Systeme für den Nachweis der pathogenen *C. sakazakii* Serotypen O1, O2, O3, O7 und des *C. malonaticus* O2-Serotyps zur Verfügung.

VI. SUMMARY

Development and evaluation of monoclonal antibody-based sandwich enzyme immunoassays for the serotype-specific detection of *Cronobacter sakazakii*

An infection with *Cronobacter sakazakii* poses a health risk especially for neonates. The standardized cultural procedure for the analysis of powdered infant formula (PIF) is associated with a significant workload of up to 6 days. Since established PCR as well as enzyme immunoassay (EIA) methods cannot meet the requirements for reliable and low-priced rapid detection methods, in this study, monoclonal antibody (mAb)-based sandwich EIAs were established for the serotype-specific detection of *C. sakazakii* of the serotypes O1, O2, O3, O7 as well as *C. malonaticus* of the serotype O2. For this purpose all *Cronobacter* spp. strains (n=91) from the strain collection were characterized at genus-, species-, and serotype-level using PCR. Selected strains were treated with polymyxin B in order to obtain a preparation, rich in protein and LPS, which was then used for the immunization of mice. The established mAbs, all of the IgG-subtype, were thoroughly characterized using indirect EIAs, immunoblot, immunofluorescence and motility assays. Thereby, polysaccharide and flagella structures were identified as antigenic determinants. Furthermore, the serotype specific reaction of mAb 1C4 (*C. sakazakii* O1), 2F8 (*C. sakazakii* O2), 1E8 (*C. malonaticus* O2) and 2B7 (*C. sakazakii* O7) was confirmed. While these mAbs showed no cross-reactivity with other members of the *Enterobacteriaceae* family, the mAb 1A11 showed considerable reactivity with *C. sakazakii* strains of the serotype O3 and *C. muytjensii* strains of the serotype O1, due to the same LPS structure of these serotypes.

Using these mAbs, it was possible to establish sandwich EIAs, and strain specific detection limits of 2×10^3 - 5×10^6 CFU/ml in pure bacteria culture could be realized. Further on, the applicability of the sandwich EIAs for the detection of *C. sakazakii* of the serotypes O1-O3 in PIF was demonstrated: low bacterial cell counts of 1 CFU per 10 g artificially contaminated PIF were reliably detected after an enrichment step of 15 h. Thus, sensitive, robust and highly specific immunochemical systems for the detection of pathogenic *C. sakazakii* of the serotypes O1, O2, O3, O7 and *C. malonaticus* serotype O2 are available for the first time.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

ALSONOSI, A., S. HARIRI, M. KAJSIK, M. ORIESKOVA, V. HANULIK, M. RODEROVA, J. PETRZELOVA, H. KOLLAROVA, H. DRAHOVSKA, S. FORSYTHE & O. HOLY (2015):

The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 34, 1979-1988.

ARBATSKY, N. P., M. WANG, A. S. SHASHKOV, A. O. CHIZHOV, L. FENG, Y. A. KNIREL & L. WANG (2010):

Structure of the O-polysaccharide of *Cronobacter sakazakii* O2 with a randomly O-acetylated l-rhamnose residue. Carbohydr Res. 345, 2090-2094.

ARBATSKY, N. P., Y. SUN, A. S. SHASHKOV, M. WANG, B. LIU, E. D. DAEVA, L. WANG & Y. A. KNIREL (2012):

Structure and genetics of the O-antigen of *Cronobacter sakazakii* G2726 (serotype O3) closely related to the O-antigen of *C. muytjensii* 3270. Carbohydr Res. 355, 50-55.

BARRON, J. C. & S. J. FORSYTHE (2007):

Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. J Food Prot. 70, 2111-2117.

BAUMGARTNER, A., M. GRAND, M. LINIGER & C. IVERSEN (2009):

Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. Int J Food Microbiol. 136, 189-192.

BLAŽKOVÁ, M., B. JAVURKOVÁ, J. VLACH, S. GÖSELOVÁ, L. KARAMONOVÁ, P. OGRODZKI, S. FORSYTHE & L. FUKAL (2015):

Diversity of O antigens within the genus *Cronobacter*: from disorder to order. Appl Environ Microbiol. 81, 5574-5582.

BOLTON, F. J., E. FRITZ, S. POYNTON & T. JENSEN (2000):

Rapid enzyme-linked immunoassay for detection of *Salmonella* in food and feed products: performance testing program. J AOAC Int. 83, 299-303.

BOWEN, A. B. & C. R. BRADEN (2006):

Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. Emerg Infect Dis. 12, 1185-1189.

BRADY, C., I. CLEENWERCK, S. VENTER, T. COUTINHO & P. DE VOS (2013):

Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*.
Syst Appl Microbiol. 36, 309-319.

BREEUWER, P., A. LARDEAU, M. PETERZ & H. M. JOOSTEN (2003):

Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*.
J Appl Microbiol. 95, 967-973.

BRENNER, D. J. (1974):

DNA reassociation for the clinical differentiation of enteric bacteria.
Public Health Lab. . 32:118-130.

CDC (2011):

FDA and CDC Update: Investigation of *Cronobacter* bacteria illness in infants.
Media Statement. Atlanta, GA, USA
http://www.cdc.gov/media/releases/2011/s1230_Cronobacter.html

CHEN, Y., T. S. HAMMACK, K. Y. SONG & K. A. LAMPEL (2009):

Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study.
J AOAC Int. 92, 862-872.

FAO/WHO (2004):

Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological risk assessment series 6, meeting report.
ISBN 92 4 156262 5.

FARMER, J. J., M. A. ASBURY, F. W. HICKMAN & D. J. BRENNER (1980):

Enterobacter sakazakii - a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens.
Int J Syst Bacteriol. 30, 569-584.

FLORES, J. P., S. A. MEDRANO, J. S. SANCHEZ & E. FERNANDEZ-ESCARTIN (2011):

Two cases of hemorrhagic diarrhea caused by *Cronobacter sakazakii* in hospitalized nursing infants associated with the consumption of powdered infant formula.
J Food Prot. 74, 2177-2181.

FRICKER-FEER, C., N. CERNELA, S. BOLZAN, A. LEHNER & R. STEPHAN (2011):

Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species.

Int J Food Microbiol. 146, 200-202.

FRIEDEMANN, M. (2007):

Enterobacter sakazakii in food and beverages (other than infant formula and milk powder).

Int J Food Microbiol. 116, 1-10.

FRIEDEMANN, M. (2009):

Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 28, 1297-1304.

GAKUYA, F. M., M. N. KYULE, P. B. GATHURA & S. KARIUKI (2001):

Antimicrobial resistance of bacterial organisms isolated from rats.

East Afr Med J. 78, 646-649.

GALILI, D., N. TAGGER, M. N. SELA & A. A. GARFUNKEL (1995):

Surveillance of oral cultures for *Enterobacteriaceae* during bone-marrow transplantation.

Eur J Cancer B Oral Oncol. 31B, 58-62.

GOSNEY, M. A., M. V. MARTIN, A. E. WRIGHT & M. GALLAGHER (2006):

Enterobacter sakazakii in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia.

Eur J Intern Med. 17, 185-188.

GRIM, C. J., M. L. KOTEWICZ, K. A. POWER, G. GOPINATH, A. A. FRANCO, K. G. JARVIS, Q. Q. YAN, S. A. JACKSON, V. SATHYAMOORTHY, L. HU, F. PAGOTTO, C. IVERSEN, A. LEHNER, R. STEPHAN, S. FANNING & B. D. TALL (2013):

Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation.

BMC Genomics. 14, doi: 10.1186/1471-2164-14-366.

HAMILTON, J. V., M. J. LEHANE & H. R. BRAIG (2003):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*.

Emerg Infect Dis. 9, 1355-1356.

HARTMANN, I., P. CARRANZA, A. LEHNER, R. STEPHAN, L. EBERL & K. RIEDEL (2010):

Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation.

Appl Environ Microbiol. 76, 2251-2261.

HOCHER, I. & J. ŠKVOR (2009):

Characterisation of antibodies for the immunochemical detection of *Enterobacter sakazakii*.

Czech J Food Sci. 27, 66-74.

HURRELL, E., E. KUCEROVA, M. LOUGHLIN, J. CAUBILLA-BARRON & S. J. FORSYTHE (2009):

Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*.
Int J Food Microbiol. 136, 227-231.

IVERSEN, C., M. LANE & S. J. FORSYTHE (2004):

The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk.
Lett Appl Microbiol. 38, 378-382.

IVERSEN, C., A. LEHNER, N. MULLANE, E. BIDLAS, I. CLEENWERCK, J. MARUGG, S. FANNING, R. STEPHAN & H. JOOSTEN (2007a):

The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1.
BMC Evol Biol. 7, doi: 10.1186/1471-2148-7-64.

IVERSEN, C., A. LEHNER, N. MULLANE, J. MARUGG, S. FANNING, R. STEPHAN & H. JOOSTEN (2007b):

Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*).
J Clin Microbiol. 45, 3814-3816.

IVERSEN, C., P. DRUGGAN, S. SCHUMACHER, A. LEHNER, C. FEER, K. GSCHWEND, H. JOOSTEN & R. STEPHAN (2008a):

Development of a novel screening method for the isolation of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*).
Appl Environ Microbiol. 74, 2550-2553.

IVERSEN, C., N. MULLANE, B. MCCARDELL, B. D. TALL, A. LEHNER, S. FANNING, R. STEPHAN & H. JOOSTEN (2008b):

Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.
Int J Syst Evol Microbiol. 58, 1442-1447.

JARADAT, Z. W., Q. O. ABABNEH, I. M. SAADOUN, N. A. SAMARA & A. M. RASHDAN (2009):

Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing.
BMC Microbiol. 9, doi: 10.1186/1471-2180-9-225.

JARADAT, Z. W., A. M. RASHDAN, Q. O. ABABNEH, S. A. JARADAT & A. K. BHUNIA (2011):

Characterization of surface proteins of *Cronobacter muytjensii* using monoclonal antibodies and MALDI-TOF Mass spectrometry.

BMC Microbiol. 11, doi: 10.1186/1471-2180-11-148.

JARVIS, K. G., C. J. GRIM, A. A. FRANCO, G. GOPINATH, V. SATHYAMOORTHY, L. HU, J. A. SADOWSKI, C. S. LEE & B. D. TALL (2011):

Molecular characterization of *Cronobacter* lipopolysaccharide O-antigen gene clusters and development of serotype-specific PCR assays.

Appl Environ Microbiol. 77, 4017-4026.

JARVIS, K. G., Q. Q. YAN, C. J. GRIM, K. A. POWER, A. A. FRANCO, L. HU, G. GOPINATH, V. SATHYAMOORTHY, M. L. KOTEWICZ, M. H. KOTHARY, C. LEE, J. SADOWSKI, S. FANNING & B. D. TALL (2013):

Identification and characterization of five new molecular serogroups of *Cronobacter* spp.

Foodborne Pathog Dis. 10, 343-352.

JAVURKOVÁ, B., M. BLAŽKOVÁ, L. FUKAL & P. RAUCH (2012):

Rapid detection of genus *Cronobacter* in powdered infant formula milk.

European Food Research and Technology. 234, 1099-1104.

JOSEPH, S., E. CETINKAYA, H. DRAHOVSKA, A. LEVICAN, M. J. FIGUERAS & S. J. FORSYTHE (2012a):

Cronobacter condimenti sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients.

Int J Syst Evol Microbiol. 62, 1277-1283.

JOSEPH, S., P. DESAI, Y. JI, C. A. CUMMINGS, R. SHIH, L. DEGORICIJA, A. RICO, P. BRZOSKA, S. E. HAMBY, N. MASOOD, S. HARIRI, H. SONBOL, N. CHUZHANOVA, M. MCCLELLAND, M. R. FURTADO & S. J. FORSYTHE (2012b):

Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species.

PLoS One. 7, doi: 10.1371/journal.pone.0049455.

JOSEPH, S., H. SONBOL, S. HARIRI, P. DESAI, M. MCCLELLAND & S. J. FORSYTHE (2012c):

Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing.

J Clin Microbiol. 50, 3031-3039.

KIM, J. B., S. H. CHO, Y. B. PARK, J. B. LEE, J. C. KIM, B. K. LEE, H. K. LEE & H. S. CHAE (2008):

Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people.

Yonsei Med J. 49, 1017-1022.

KIM, K., K. P. KIM, J. CHOI, J. A. LIM, J. LEE, S. HWANG & S. RYU (2010):
Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral
invasion of *Cronobacter sakazakii*.
Appl Environ Microbiol. 76, 5188-5198.

KLEINSTEUBER, I. (2015):
Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von
Cronobacter spp. .
Diss. med. vet., LMU München.

KOTHARY, M. H., B. A. MCCARDELL, C. D. FRAZAR, D. DEER & B. D.
TALL (2007):
Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and
development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*.
Appl Environ Microbiol. 73, 4142-4151.

KUZINA, L. V., J. J. PELOQUIN, D. C. VACEK & T. A. MILLER (2001):
Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican
fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae).
Curr Microbiol. 42, 290-294.

KWON, K. H., S. Y. HWANG, Y. K. PARK, J. W. YOON, S. KIM & J. HONG
(2014):
A quantitative real-time immuno-PCR assay for detection of *Staphylococcus*
aureus enterotoxin H.
J Food Saf. doi: 10.1111/jfs.12120.

LAI, K. K. (2001):
Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults.
Case reports and a review of the literature.
Medicine (Baltimore). 80, 113-122.

LAW, J. W. F., N. S. AB MUTALIB, K. G. CHAN & L. H. LEE (2015):
Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles,
applications, advantages and limitations.
Front Microbiol. 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00770.

LEHNER, A., S. NITZSCHE, P. BREEUWER, B. DIEP, K. THELEN & R.
STEPHAN (2006):
Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based
identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection.
BMC Microbiol. 6, 15. doi: 10.1186/1471-2180-6-15.

LIU, B., Y. A. KNIREL, L. FENG, A. V. PEREPELOV, S. N. SENCHENKOVA,
Q. WANG, P. R. REEVES & L. WANG (2008a):
Structure and genetics of *Shigella* O antigens.
FEMS Microbiol Rev. 32, 627-653.

LIU, Y., P. FRATAMICO, C. DEBROY, A. C. BUMBAUGH & J. W. ALLEN (2008b):

DNA sequencing and identification of serogroup-specific genes in the *Escherichia coli* O118 O antigen gene cluster and demonstration of antigenic diversity but only minor variation in DNA sequence of the O antigen clusters of *E. coli* O118 and O151.

Foodborne Pathog Dis. 5, 449-457.

LIU, B., L. D. ZHANG, X. N. ZHU, C. L. SHI, J. CHEN, W. B. LIU, X. H. HE & X. M. SHI (2011):

PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics.

Int J Food Microbiol. 144, 511-518.

MACLEAN, L. L., F. PAGOTTO, J. M. FARBER & M. B. PERRY (2009a):

Structure of the antigenic repeating pentasaccharide unit of the LPS O-polysaccharide of *Cronobacter sakazakii* implicated in the Tennessee outbreak.

Biochem Cell Biol. 87, 459-465.

MACLEAN, L. L., E. VINOGRADOV, F. PAGOTTO, J. M. FARBER & M. B. PERRY (2009b):

Characterization of the O-antigen in the lipopolysaccharide of *Cronobacter (Enterobacter) malonaticus* 3267.

Biochem Cell Biol. 87, 927-932.

MILED-BENNOUR, R., T. C. ELLS, F. J. PAGOTTO, J. M. FARBER, A. KEROUANTON, T. MEHEUT, P. COLIN, H. JOOSTEN, A. LECLERCQ & N. G. BESSE (2010):

Genotypic and phenotypic characterisation of a collection of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* isolates.

Int J Food Microbiol. 139, 116-125.

MITTAL, R., Y. WANG, C. J. HUNTER, I. GONZALEZ-GOMEZ & N. V. PRASADARAO (2009):

Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A.

Lab Invest. 89, 263-277.

MOZROVÁ, V., N. BŘEŇOVÁ, J. MRÁZEK, D. LUKEŠOVÁ & M.

MAROUNEK (2014):

Surveillance and characterisation of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples.

Folia Microbiologica. 59, 63-68.

MULLANE, N., P. O'GAORA, J. E. NALLY, C. IVERSEN, P. WHYTE, P. G. WALL & S. FANNING (2008):

Molecular analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-antigen gene locus.

Appl Environ Microbiol. 74, 3783-3794.

NAIR, M. K., K. VENKITANARAYANAN, L. K. SILBART & K. S. KIM (2009):

Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells. Foodborne Pathog Dis. 6, 495-501.

NAZAROWEC-WHITE, M. & J. M. FARBER (1997a):

Enterobacter sakazakii: a review. Int J Food Microbiol. 34, 103-113.

NAZAROWEC-WHITE, M. & J. M. FARBER (1997b):

Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula.

Lett Appl Microbiol. 24, 9-13.

NIEMEYER, C. M., M. ADLER & R. WACKER (2007):

Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. Nat Protoc. 2, 1918-1930.

NORIEGA, F. R., K. L. KOTLOFF, M. A. MARTIN & R. S. SCHWALBE (1990):

Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. Pediatr Infect Dis J. 9, 447-449.

OSAILI, T. M., R. R. SHAKER, M. S. AL-HADDAQ, A. A. AL-NABULSI & R. A. HOLLEY (2009):

Heat resistance of *Cronobacter species* (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. J Appl Microbiol. 107, 928-935.

PAGOTTO, F. J., M. NAZAROWEC-WHITE, S. BIDAVID & J. M. FARBER (2003):

Enterobacter sakazakii: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J Food Prot. 66, 370-375.

PARK, S., S. SHUKLA, Y. KIM, S. OH, S. HUN KIM & M. KIM (2012):

Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*). Microbiol Immunol. 56, 472-479.

PATRICK, M. E., B. E. MAHON, S. A. GREENE, J. ROUNDS, A. CRONQUIST, K. WYMORE, E. BOOTHE, S. LATHROP, A. PALMER & A. BOWEN (2014):

Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. Emerg Infect Dis. 20, 1520-1523.

SANO, T., C. L. SMITH & C. R. CANTOR (1992):

Immuno-PCR - very sensitive antigen-detection by means of specific antibody-DNA conjugates. Science. 258, 120-122.

SCHAUER, K., A. LEHNER, R. DIETRICH, I. KLEINSTEUBER, R. CANALS, K. ZURFLUH, K. WEINER & E. MÄRTLBAUER (2015):
A *Cronobacter turicensis* O1 antigen-specific monoclonal antibody inhibits bacterial motility and entry into epithelial cells.
Infect Immun. 83, 876-887.

SEO, K. H. & R. E. BRACKETT (2005):
Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay.
J Food Prot. 68, 59-63.

SIMMONS, B. P., M. S. GELFAND, M. HAAS, L. METTS & J. FERGUSON (1989):
Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula.
Infect Control Hosp Epidemiol. 10, 398-401.

SMITH, S. G., V. MAHON, M. A. LAMBERT & R. P. FAGAN (2007):
A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression.
FEMS Microbiol Lett. 273, 1-11.

STEPHAN, R., S. VAN TRAPPEN, I. CLEENWERCK, C. IVERSEN, H. JOOSTEN, P. DE VOS & A. LEHNER (2008):
Enterobacter pulveris sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment.
Int J Syst Evol Microbiol. 58, 237-241.

STEPHAN, R., C. J. GRIM, G. R. GOPINATH, M. K. MAMMEL, V. SATHYAMOORTHY, L. H. TRACH, H. R. CHASE, S. FANNING & B. D. TALL (2014):
Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively.
Int J Syst Evol Microbiol. 64, 3402-3410.

STOLL, B. J., N. HANSEN, A. A. FANAROFF & J. A. LEMONS (2004):
Enterobacter sakazakii is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants.
J Pediatr. 144, 821-823.

STOOP, B., A. LEHNER, C. IVERSEN, S. FANNING & R. STEPHAN (2009):
Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*.
Int J Food Microbiol. 136, 165-168.

SUN, Y., M. WANG, H. LIU, J. WANG, X. HE, J. ZENG, X. GUO, K. LI, B. CAO & L. WANG (2011):
Development of an O-antigen serotyping scheme for *Cronobacter sakazakii*.
Appl Environ Microbiol. 77, 2209-2214.

SUN, Y., M. WANG, Q. WANG, B. CAO, X. HE, K. LI, L. FENG & L. WANG (2012):

Genetic analysis of the *Cronobacter sakazakii* O4 to O7 O-antigen gene clusters and development of a PCR assay for identification of all *C. sakazakii* O serotypes. *Appl Environ Microbiol.* 78, 3966-3974.

TOWNSEND, S. M., E. HURRELL, I. GONZALEZ-GOMEZ, J. LOWE, J. G. FRYE, S. FORSYTHE & J. L. BADGER (2007):

Enterobacter sakazakii invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat.

Microbiology. 153, 3538-3547.

TSAI, H. Y., C. H. LIAO, Y. T. HUANG, P. I. LEE & P. R. HSUEH (2013):

Cronobacter infections not from infant formula, Taiwan.

Emerg Infect Dis. 19, 167-169.

WANG, L., Q. WANG & P. R. REEVES (2010):

The variation of O antigens in Gram-negative bacteria.

Subcell Biochem. 53, 123-152.

WANG, Y., Y. L. XU, A. V. PEREPELOV, Y. Y. QI, Y. A. KNIREL, L. WANG & L. FENG (2007):

Biochemical characterization of dTDP-D-Qui4N and dTDP-D-Qui4NAc biosynthetic pathways in *Shigella dysenteriae* type 7 and *Escherichia coli* O7.

J Bacteriol. 189, 8626-8635.

WHO/FAO (2007):

Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. Guidelines. Geneva, Switzerland. ISBN 978 92 4 159541 4.

XU, X., Y. ZHANG, M. SHI, W. SHENG, X. J. DU, M. YUAN & S. WANG (2014):

Two novel analytical methods based on polyclonal and monoclonal antibodies for the rapid detection of *Cronobacter* spp.: Development and application in powdered infant formula.

LWT-Food Sci Technol. 56, 335-340.

XU, X., C. LI, Q. WU, J. ZHANG, J. HUANG & G. YANG (2015):

Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods.

Int J Food Microbiol. 204, 17-23.

YAN, Q. Q., O. CONDELL, K. POWER, F. BUTLER, B. D. TALL & S. FANNING (2012):

Cronobacter species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium.

J Appl Microbiol. 113, 1-15.

YAN, Q., J. WANG, J. GANGIREDLA, Y. CAO, M. MARTINS, G. R. GOPINATH, R. STEPHAN, K. LAMPEL, B. D. TALL & S. FANNING (2015): Comparative genotypic and phenotypic analysis of *Cronobacter* species cultured from four powdered infant formula production facilities: Indication of pathoadaptation along the food chain. *Appl Environ Microbiol.* 81, 4388-4402.

YAN, Q. & S. FANNING (2015): Strategies for the identification and tracking of *Cronobacter* species: an opportunistic pathogen of concern to neonatal health. *Front Pediatr.* 3, doi: 10.3389/fped.2015.00038.

YOSHINO, N., M. ENDO, H. KANNO, N. MATSUKAWA, R. TSUTSUMI, R. TAKESHITA & S. SATO (2013): Polymyxins as Novel and Safe Mucosal Adjuvants to Induce Humoral Immune Responses in Mice. *PloS One.* 8, doi: 10.1371/journal.pone.0061643

VIII. ANHANG

Zusätzlich zu den in der Publikation (III., S. 18 ff.) genannten monoklonalen Antikörpern (mAks) gegen *C. sakazakii* der Serotypen O1 (mAk 1C4), O2 (mAk 2F8) bzw. O3 (mAk 1A11), wurden auch serotypspezifische mAks für den Nachweis von *C. sakazakii* Serotyp O7 und von *C. malonaticus* Serotyp O2 generiert. Für die Etablierung dieser mAks, war die Vorgehensweise bei der Herstellung des Immunisierungsmaterials, der Immunisierung und der Charakterisierung der mAks mittels indirekter Enzymimmuntests (EIAs), Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunoblot identisch mit den in der Publikation (III., S. 21 ff.) genannten Schritten.

1. Monoklonale Antikörper gegen *C. sakazakii* Serotyp O7

Für den Nachweis von *C. sakazakii* Serotyp O7 konnten die beiden mAks 1E2 und 2B7 etabliert werden. In Analysen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie resultierte die Färbung von *C. sakazakii* Serotyp O7-Stämmen mit dem mAk 1E2 (O7) in einer auf der gesamten Zelloberfläche gleichmäßig verteilten Fluoreszenz (Abbildung A1) und im Immunoblot in einem für Polysaccharid spezifischen Bandenmuster (Abbildung A2). Daraus lässt sich zunächst schließen, dass Polysaccharidstrukturen, wie Lipopolysaccharid (LPS), Exopolysaccharid (EPS) oder Kapselbestandteile auf der Bakterienoberfläche die antigene Determinante dieses mAks darstellen. Der mAk 2B7 (O7) hingegen zeigte im Immunoblot eine singuläre Bande bei ca. 23 kDa (Abbildung A2), anschließende immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass bei den Keimen dieses Protein im Bereich der Flagellen lokalisiert ist. Eine Darstellung der gleichzeitigen Bindung beider mAks an *C. sakazakii*-Stämme des Serotyps O7 konnte in der Immunfluoreszenz realisiert werden (Abbildung A1).

Da die beiden mAks 1E2 (O7) und 2B7 (O7) im indirekten EIA jeweils nicht mit allen getesteten *C. sakazakii* Serotyp O7-Stämmen reagieren, sich aber in ihrer Reaktivität gegenseitig ergänzen (Tabelle A1), könnten theoretisch mit einer Kombination der beiden mAks die überwiegende Mehrheit von *C. sakazakii* Serotyp O7-Stämme nachgewiesen werden. Lediglich der Stamm MHI 21135 zeigte weder mit dem einen noch mit dem anderen mAk eine Reaktivität.

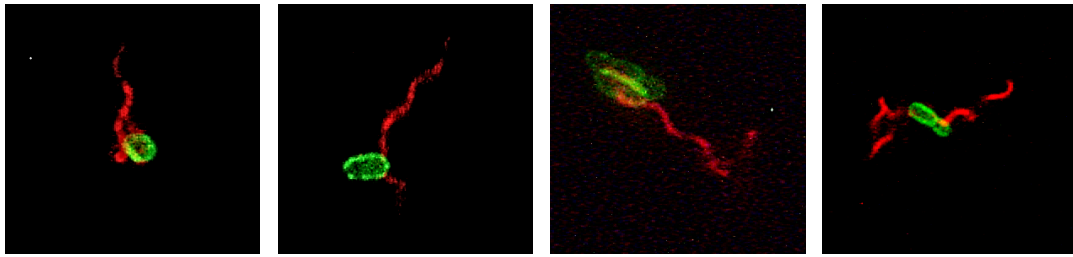


Abbildung A1. Immunfluoreszenzaufnahmen von *C. sakazakii* MHI 21109 (Serotyp O7) nach Doppelfärbung der Polysaccharid-/Flagellen-Strukturen. Die Polysaccharide (grün) wurden mit dem primären mAk 1E2 und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse) angefärbt. Für die Anfärbung der Flagellen wurde der primäre mAk 2B7 an Alexa Fluor555 gekoppelt und direkt eingesetzt.

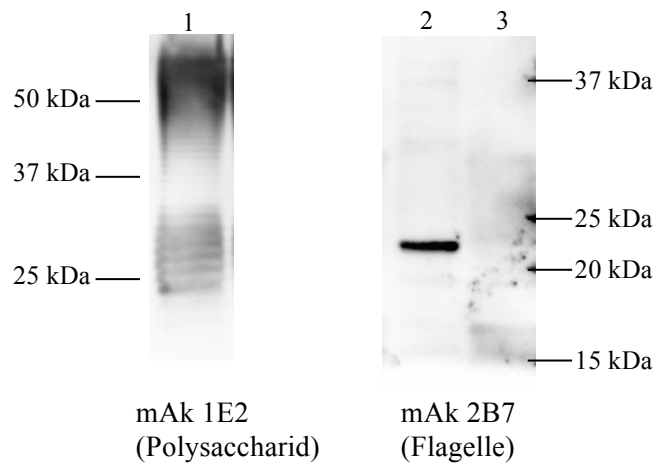


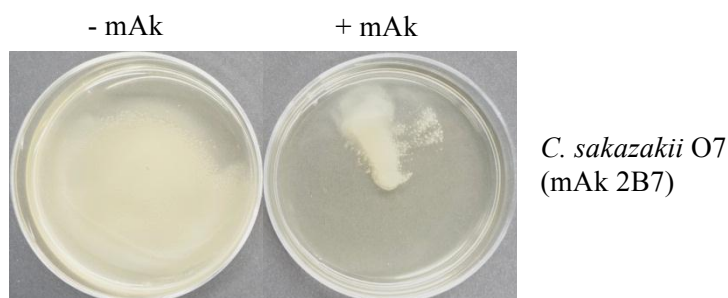
Abbildung A2. Immunoblot Analysen zur Reaktivität der Serotyp O7-spezifischen mAks 1E2 und 2B7. 1: LPS des *C. sakazakii* Serotyp O7-Stammes MHI 21066; 2: Gesamtprotein MHI 21066 ohne Proteinase K-Behandlung; 3: Gesamtprotein MHI 21066 nach Proteinase K-Behandlung.

Tabelle A1: Vergleich der Reaktivität der mAks 1E2 und 2B7 mit *C. sakazakii* Serotyp O7-Stämmen im indirekten EIA.

<i>C. sakazakii</i> MHI	Herkunft	Reaktivität	
		mAk 1E2	mAk 2B7
993	Babynahrung	++	-
21066	Milchpulver	-	++
21109	Lebensmittel	++	++
21110	PIF-Betrieb	++	+
21111	PIF-Betrieb	++	+
21133	Lebensmittel	+	++
21134	Lebensmittel	+	++
21135	Lebensmittel	-	-
21136	Babynahrung	+	++
21171	Babynahrung	+	++
21173	Milchpulver	++	-

++ Extinktionswerte zwischen 3,5-1,8 bei einer Bakterienverdünnung von 1:1000
 + Extinktionswerte zwischen 1,7-0,2 bei einer Bakterienverdünnung von 1:1000
 - Extinktionswerte < 0,08 bei einer Bakterienverdünnung von 1:400

Zur weiteren Charakterisierung des mAks 2B7 (O7) wurde ein Motility Assay eingesetzt. Während der *C. sakazakii* Stamm MHI 21066 (Serotyp O7) ohne Zugabe des mAks eine ausgeprägte Motilität aufwies, resultierte die Zugabe des mAks 2B7 in einer deutlichen Reduktion der Motilitätszone (Abbildung A3).

**Abbildung A3. Hemmung der Flagellenbewegung im Motilitätsassay.** Motilitätszonen des *C. sakazakii* Serotyp O7-Stammes MHI 21066 in LB-Weichagar ohne und mit Zugabe des mAks 2B7.

2. Monoklonale Antikörper gegen *C. malonaticus* Serotyp O2

Der mAk 1E8 gegen *C. malonaticus* Serotyp O2 reagierte in indirekten EIAs zwar spezies- und serotypspezifisch, allerdings nur mit etwa der Hälfte der getesteten *C. malonaticus* Serotyp O2-Stämme. In Analysen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnten zwei verschiedene Reaktionsmuster unterschieden werden. Stämme, die im indirekten EIA positiv reagierten zeichneten sich auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie durch eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenz auf der Bakterienoberfläche aus. Hinsichtlich der im indirekten EIA negativ reagierenden Stämme, konnte hingegen eine punktuelle Verteilung der Fluoreszenz beobachtet werden. Isoliertes Polysaccharid dieser Stämme ließ sich außerdem in Immunoblot-Analysen nicht mit dem mAk 1E8 anfärben und zeigte somit kein charakteristisches Bandenmuster. Lediglich zwischen 75-50 kDa war für den *C. malonaticus* Stamm MHI 21002 eine geringe Reaktivität zu verzeichnen (Abbildung A4).

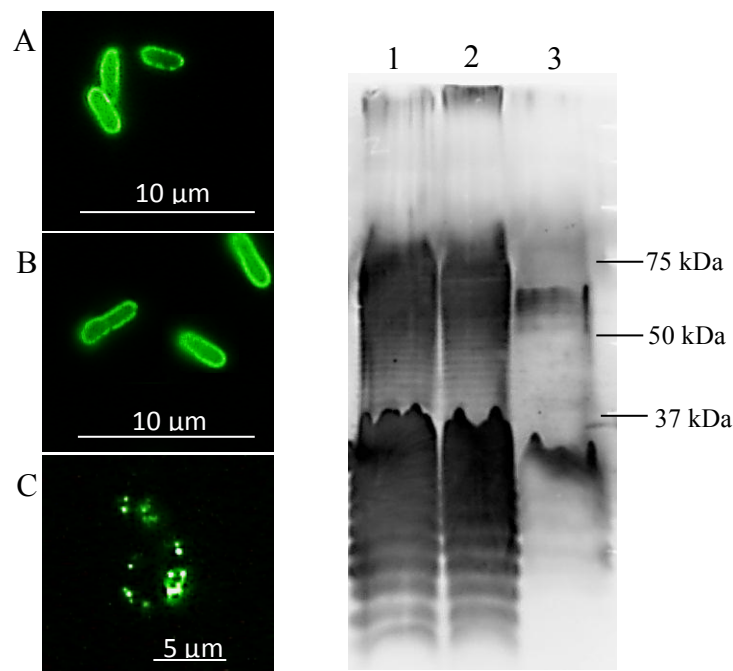


Abbildung A4: Immunfluoreszenzaufnahme und Immunoblot-Analysen zur Reaktivität von *C. malonaticus* Serotyp O2-Stämmen mit dem mAk 1E8. A: MHI 986; B: MHI 987; C: MHI 21002; 1: LPS MHI 986; 2: LPS MHI 987; 3: LPS MHI 21002

Diejenigen Stämme, die im indirekten EIA positiv reagierten und in Analysen mittels Immunfluoreszenz eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenz auf der Bakterienoberfläche aufwiesen, wurden im Motilitätsassay nach Zugabe des mAks in ihrer Motilität gehemmt (Abbildung A5). Stämme, die im indirekten EIA nicht und in der Immunfluoreszenzmikroskopie nur punktuell mit dem mAk 1E8 reagierten, konnten ihre Motilität im LB-Weichagar auch nach Zugabe des mAks 1E8 beibehalten (Ergebnisse nicht dargestellt).

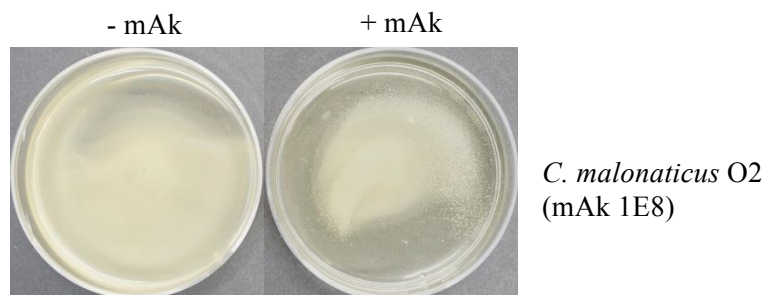


Abbildung A5. Hemmung der Flagellenbewegung im Motilitätsassay. Motilitätszonen des *C. malonaticus* Serotyp O2-Stammes MHI 986 in LB-Weichagar ohne und mit Zugabe des mAks 1E8.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stets freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für einen Arbeitsplatz, an dem ich mich immer sehr wohl gefühlt habe.

Herrn Dr. R. Dietrich danke ich für die hervorragende Betreuung, für seine fundierten Anregungen und seinen Witz, die jedes Problem lösbar erscheinen ließen und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. K. Schauer für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und ihr Engagement bei der Anfertigung dieser Arbeit, für ihr Vertrauen in meine Arbeit und dafür, dass sie mir so viel beigebracht hat.

Frau G. Acar, Frau F. Farber und Frau B. Minich danke ich sehr herzlich für die Einarbeitung in den ersten Monaten, für die ausgezeichnete technische Unterstützung und für die freundliche Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für das tolle Arbeitsklima und für die bereitwillige tatkräftige Unterstützung in sämtlichen fachlichen Fragen bedanken. Insbesondere danke ich Angela, Claudia, Christoph, Franziska und Joyce für die schöne Zeit und die freundschaftliche Verbundenheit! Danke für schöne Pausen mit Kuchen, für die Knabber- und Schokoladenvorräte im Büro, Ausflüge, Ablenkung und eure Unterstützung.

Ein großer Dank gilt meinen Sportsfreunden bei der Taekwondo-Abteilung des TSV Schleißheim für die tolle Gemeinschaft! Danke Karin und Udo für euer super Training bei dem ich immer mal Dampf ablassen konnte.

Bei meiner kleinen Dinner-Gang Eva und Leo bedanke ich mich für viele schöne ausgelassene Stunden. Ich wünschte, wir hätten uns schon viel früher kennengelernt.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Freundinnen Ola und Mille für ihre Freundschaft, auf die ich mich in den letzten 9 Jahren immer verlassen konnte und die mir auch während dieser Arbeit Halt gegeben hat.

Unendlich dankbar bin ich meinen Eltern, meinen großen Brüdern Franz und Ludwig und deren Familien! Danke, dass ihr mir zeigt worauf es wirklich ankommt. Danke für euren bedingungslosen Rückhalt, eure Liebe und Unterstützung.

Von Herzen danke ich Max dafür, dass er mich auf diesem gemeinsamen Weg immer unterstützt, beruhigt und zum Lachen gebracht hat. Du machst mein Leben reicher!